



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA
BIOLOGIJU I EKOLOGIJU



Mariana Seke

**Uloga dva nanokompozita fulerenol/doksorubicin i
fulerenol/gvožđe kod toksičnih efekata izazvanih
doksorubicinom**

- doktorska disertacija -

Novi Sad, 2020. godina

ZAHVALNICA

Ova doktorska teza je urađena u okviru nacionalnog projekta br. III 45005 „Funkcionalni, funkcionalizovani i usavršeni nanomaterijali” koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Srbije.

Eksperimentalni deo istraživanja ove doktorske disertacije je urađen u Institutu za nuklearne nauke „Vinča” Univerziteta u Beogradu, Zavodu za Eksperimentalnu onkologiju Instituta za Onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici, Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta, Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta, Tehnološkom fakultetu i Medicinskom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, Institutu „Jožef Štefan” u Ljubljani, Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, Institutu za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić” Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Institutu tehničkih nauka srpske akademije nauka i umetnosti u Beogradu. Želela bih da izrazim zahvalnost dr Zlatku Rakočeviću rukovodiocu projekta i laboratorije 040 INN „Vinča” i dr Draganu Alavantiću rukovodiocu laboratorije 080 INN „Vinča” koji su mi omogućili terenski rad i svim ostalim kolegama i saradnicima koji su na posredan ili neposredan način doprineli realizaciji ove disertacije.

Posebno se zahvaljujem svojim mentorima i članovima Komisije:

Prof. dr Aleksandru Đorđeviću, rukovodiocu potpotprojekta i mentoru, hvala na ukazanom poverenju i pruženoj prilici da se bavim naučno-istraživačkim radom kao i da postanem deo multidisciplinarnog tima. Zahvalna sam na svemu što me je naučio, na savetima, diskusijama, čeličnom strpljenju, kako da iskoračim dalje i postanem svoja, kako da iznađem rešenje za svaki problem, a pre svega na decenijskom prijateljstvu.

Prof. dr Nebojši Andriću, mentoru, hvala na ukazanoj prilici za zajedničku saradnju i svesrdnoj pomoći u realizaciji ove doktorske teze, kao i na veoma korisnim savetima i razgovorima.

Članovima Komisije, prof. dr Danijeli Kojić, prof. dr Jeleni Purać, prof. dr Jeleni Marković i prof. dr Vladimiru Srdiću se zahvaljujem na pomoći oko pisanja teze i na njenoj kritičkoj analizi.

Dr Dragici Radojković i dr Snežani Kojić, hvala na nesebično izdvojenom vremenu i višegodišnjoj saradnji, ljubaznosti, savetima i pomoći oko eksperimentalnog dela rada, strpljenju, razumevanju i kritičkom osvrtu.

Veliku zahvalnost dugujem prijateljici i kolegici dr Danijeli Petrović Graovac na nesebično prenetom znanju, razumevanju, strpljenju, savetima i razgovorima. Na uzajamnom bodrenju da ne klonemo duhom kada hemikalija nema mesecima i kada prajmeri ne funkcionišu. Kada mi je bila potrebna hitna medicinska pomoć.

Zahvaljujem se koleginicama, dr Danici Jović, dr Ivani Borišev i dr Jasminki Mrđanović na dobrom timskom duhu svih ovih godina.

dr Milici Labudović-Borović hvala na dugogodišnjoj saradnji i pomoći oko elektronskih mikrografija.

Zahvaljujem se dr Jovani Jasnić na svekolikoj pomoći u laboratoriji i druženju.

Jeleni i Branki koje bi me uvek dočekale sa osmehom i nesebičnom željom da pomognu.

Mojim divim prijateljima Jeleni, Vladanu, Bojani, Priji, Ludilu, Pesniku, Coki i Sanjici, sam neizmerno zahvalna što su sve ove godine imali vere u mene, na iskrenosti, na pomoći, na kritikama i podržavanjima, i što imam tu privilegiju da budem deo njihovih života.

Mojim planinarima iz PSD „Poštar” Novi Sad, hvala na nezaboravnim i jedinstvenim zajedničkim trenucima u prirodi.

Najveću zahvalnost dugujem članovima svoje porodice, mojim Roditeljima koji su mi pružili svu ljubav i podršku da se obrazujem, Bratu Nenadu bez koga ne bih bila ličnost kakva sam danas, kao i mojoj Snajki Ivani, i mojim Bratićima, Irini i Viktoru, koji me neizmerno uveseljavaju.

U sećanje na moju Tetku Danu

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Fulerenoli	2
1.1.1 Fizičko-hemijske i nano karakteristike fulerenola	2
1.1.2 Hemijske osobine fulerenola.....	4
1.1.3 Prooksidativne osobine fulerenola	5
1.1.4 Antioksidativne osobine fulerenola	6
1.1.5 Biološke aktivnosti fulerenola.....	7
1.1.6 Farmakokinetika fulerenola	8
1.1.7 Molekularnobiološki mehanizam antioksidativnog delovanja fulerenola	9
1.2 Doksorubicin	11
1.2.1 Mehanizam citotoksičnosti DOX-a u tumorskim ćelijama.....	12
1.2.2 Mehanizmi kardioksičnosti DOX-a	15
1.2.3 Mehanizmi hepatoksičnosti DOX-a.....	22
1.2.4 Prevencija kardioksičnosti i hepatoksičnosti indukovane DOX-om	23
1.2.5 Gvožđe, njegova uloga u metabolizmu i homeostaza	24
1.2.6 Nanoformulacije DOX-a i mehanizmi njegovog delovanja.....	27
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	30
3. MATERIJAL I METODE.....	32
3.1 Sinteza nanokompozita FNP/DOX	32
3.2 Sinteza nanokompozita FNP/Fe ²⁺	32
3.3 Metode za fizičko-hemijsku i nanokarakterizaciju nanokompozita FNP/DOX i FNP/Fe ²⁺	32
3.3.1 Merenje veličine i naelektrisanja nanočestica.....	33
3.3.2 Mikroskopija atomskim silama (AFM , eng. <i>Atomic Force Microscopy</i>) ...	33
3.3.3 Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)	34
3.3.4 Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM) kuplovana sa spektroskopijom zasnovanoj na disperzivnim X zracima (EDS, eng. <i>Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy</i>)	34
3.4 Metode za ispitivanje biološke aktivnosti nanokompozita FNP/DOX <i>in vitro</i> ...	34
3.4.1 Gajenje malignih ćelijskih linija	35
3.4.2 Tretman malignih ćelija	35
3.4.3 Gajenje HI-1 ćelija	35
3.4.4 Tretman HI-1 ćelija i testiranje njihove vijabilnosti	36
3.4.5 Analiza unosa DOX-a i FNP/DOX-a u ćelije protočnom citometrijom	36
3.4.6 Analiza ćelijskog ciklusa protočnom citometrijom.....	37

3.5	Životinje, eksperimentalni dizajn i izolovanje organa	37
3.6	Priprema uzoraka tkiva za TEM	39
3.7	Ekstrakcija RNK i reverzna transkripcija	40
3.8	qRT-PCR analiza	41
3.9	Statistička obrada podataka	42
4.	REZULTATI.....	43
4.1	FNP/DOX nanokompozit.....	43
4.1.1	Nanokarakterizacija FNP-a i nanokompozita FNP/DOX	43
4.1.2	Nanokompozit FNP/DOX povećava unos DOX-a u MCF-7 i MDA-MB-231 ćelije	50
4.1.3	Nanokompozit FNP/DOX menja distribuciju MCF-7 i MDA-MB-231 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa	52
4.1.4	Nanokompozit FNP/DOX pokazuje smanjenu citotoksičnost u odnosu na DOX na kardiomiocitima miša HL-1	56
4.1.5	FNP/DOX i DOX menjaju ultrastrukturne karakteristike tkiva srca	57
4.1.6	FNP/DOX i DOX menjaju ultrastrukturne karakteristike tkiva jetre.....	67
4.1.7	DOX i FNP/DOX menjaju ekspresiju katalaze i MnSOD u srcu pacova	78
4.1.8	DOX i FNP/DOX menjaju ekspresiju Bax i Bcl-2 u srcu pacova	80
4.1.9	FNP/DOX i DOX menjaju ekspresiju katalaze i MnSOD, u jetri pacova	81
4.1.10	FNP/DOX i DOX menjaju ekspresiju Bax i Bcl-2, u jetri pacova.....	83
4.2	FNP/Fe ²⁺ nanokompozit.....	84
4.2.1	Nanokarakterizacija FNP i nanokompozita FNP/Fe ²⁺	84
4.2.2	FNP/Fe ²⁺ u predtretmanu sa DOX-om menja ultrastrukturne karakteristike tkiva srca i jetre	87
4.2.3	FNP/Fe ²⁺ u predtretmanu sa DOX-om menja ultrastrukturne karakteristike tkiva jetre.....	90
4.2.4	Predtretman nanokompozitom FNP/Fe ²⁺ ne utiče na promenu ekspresije katalaze i MnSOD u tkivu srca kod životinja tretiranih DOX-om.....	93
4.2.5	Predtretman FNP/Fe ²⁺ sprečava DOX-om izazvano povećanje ekspresije katalaze i MnSOD u jetri pacova	95
5.	DISKUSIJA	97
6.	ZAKLJUČCI.....	117
7.	LITERATURA.....	119

1. UVOD

Tumori predstavljaju drugi vodeći uzrok smrti u svetu, nakon kardiovaskularnih oboljenja, i procena je, da će učestalost pojave tumora u budućnosti porasti. U 2015. godini ustanovljeno je da je širom planete bilo 17,5 miliona ljudi koji su bolovali od tumora i da ih je umrlo oko 8,7 miliona (Fitzmaurice i sar., 2016). U poslednjoj deceniji, lečenje obolelih od tumora je značajno unapređeno usled rasvetljenih pojedinih molekularnih, ćelijskih i fizioloških mehanizama uključenih u inicijaciju i progresiju bolesti (Rosenberg, 2014; Bhat i sar., 2015; Malka-Mahieu i sar., 2017). Hemioterapija predstavlja jedan od uobičajenih i najčešće korišćenih metoda lečenja tumora koju često prate sporedni sistemski štetni efekti koji se pre svega pripisuju nespecifičnoj akumulaciji leka (Krishnan i Rajasekaran, 2014). Pri tome je važno imati na umu da sigurna doza hemioterapeutskog leka ne postoji. Sistemska oštećenja organa se dešavaju i pri niskim dozama, što ukazuje i da drugi faktori poput genetičkih varijanti, mogu imati uticaja na razvoj toksičnosti (Armenian i sar., 2013; Armenian i sar., 2015). Lečenje tumora jednim terapeutskim agensom često rezultuje ograničenim kliničkim ishodom usled heterogenosti tumora i/ili njegove rezistencije na lek. Kombinovane terapije, koje koriste različite agense sa različitim modalitetom delovanja, mogu sinergistički podići nivo antitumorske aktivnosti pri sniženim dozama svakog pojedinačnog agensa i na taj način umanjiti sporedne efekte i prevazići rezistenciju na lekove (Morton i sar., 2014). Istovremena aplikacija različitih terapeutskih agenasa zahteva dostavnu platformu kako bi se omogućila normalizacija farmakokinetike i farmakodinamike agenasa, produženo vreme cirkulisanja, selektivna akumulacija, specifično vezivanje za ciljno mesto kao i kontrolisano otpuštanje sa ciljnog mesta. Nanomaterijali, posebno polimerne nanočestice i karbonski nanomaterijali, poseduju neke od prethodno navedenih povoljnih osobina (Morton i sar., 2014; Cheng i Xue, 2016; Jović i sar., 2020). Prema Evropskoj Komisiji, nanomaterijali predstavljaju „prirodne, slučajno nastale i proizvedene materijale koji sadrže čestice u nevezanom stanju ili u obliku agregata ili aglomerata i gde više od 50% čestica ima bar jednu dimenziju u opsegu 1-100 nm” (Rauscher i sar., 2012). Međutim, granice ove definicije su još uvek rastegljive pošto se konvencionalna fizičko-hemijska

pravila ne mogu u potpunosti primeniti na nanoskali (Kreyling i sar., 2010). Stoga, u zavisnosti od polja primene nanotehnologije, veličina čestice uzeta kao odrednica za nanočesticu može varirati. Stoga se materijali sa dimenzijama do 1000 nm, u nanomedicini, smatraju nanomaterijalima (Schütz i sar., 2013).

U posebnu grupu nanomaterijala koji su danas u žiži interesovanja nanomedicine jesu oni koji poseduju antioksidativna svojstva i koji kao takvi mogu obezbediti pozitivan ishod kod bolesti ili stanja povezanih sa oksidativnim stresom (Forbot i sar., 2020). Prednosti korišćenja nanomaterijala kao antioksidanata nad trenutno dostupnim jesu: njihova prilagodljiva površina na koju se mogu vezati različite funkcionalne grupe ili agensi (Cheng i sar., 2013), mogućnost prolaza kroz ćelijsku membranu (Qiao i sar., 2007; He i sar., 2019), sposobnost vezivanja slobodnih radikala bez pomoći drugih molekula koji imaju funkciju detoksikacije (Markovic i Trajkovic, 2008), veća fizička stabilnost u biološkim medijumima (Lao i sar., 2009). Navedene osobine, nanomaterijalima, omogućavaju potencijalnu primenu u lečenju oštećenja nastalih oksidativnim stresom. U ovom kontekstu, postoji znatan broj istraživanja koja opisuju različite derivate fulerena (C_{60}) izmenjene bilo kovalentnim, bilo nekovalentnim modifikacijama, a koji su se pokazali kao biokompatibilni i sa izraženim antioksidativnim svojstvima u različitim model-sistemima (Ali i sar., 2008; Lao i sar., 2009; Misirkic i sar., 2009; Djordjevic i sar., 2015; Roursgaard i sar., 2016).

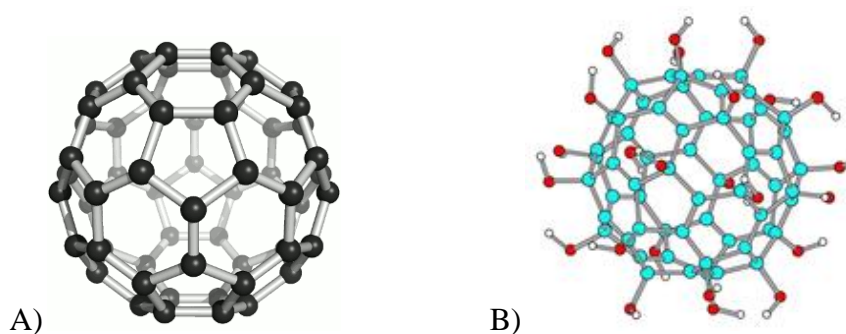
1.1 Fulerenoli

1.1.1 Fizičko-hemijske i nano karakteristike fulerenola

Otkriće fulerena datira od pre trideset godina kada su opisani kao treća alotropska modifikacija ugljenika pored grafita i dijamanta (Kroto i sar., 1985). Nakon nekoliko godina su okarakterisane nanocevi (Iijima i sar., 1991), a deceniju kasnije, grafeni (Novoselov i sar., 2004). Ugljenik je jedini element u Periodnom sistemu za koje se vezuju dve Nobelove nagrade: otkriće molekula C_{60} i grafena. Odmah nakon otkrića, karbonski nanoalotropi su privukli pažnju istraživača u nanomedicini (Wilson, 1997; Wilson i sar., 1999; Dugan i sar., 2001; Bianco i sar., 2005). Naime, jedinstvene fizičke osobine nanočestica kao što su velika površina, mala veličina, laka površinska

modifikacija, magnetne i optičke karakteristike, čine ih pogodnim kandidatima za primenu u biomedicini (Vatansever i sar., 2012).

Fulereni (C_n $540 \geq n \geq 20$) predstavljaju polihedralne zatvorene kaveze izgrađene isključivo od ugljenikovih atoma. Najpoznatiji među njima je C_{60} (Slika 1A) koji poseduje savršenu simetriju. Njegov prečnik iznosi 0.710 ± 0.007 nm. Fuleren je smeđa kristalna ili amorfna materija nerastvorna u vodi i većini nepolarnih organskih rastvarača. Hidroksilacijom fulerena dobijaju se polihidroksilovani fulereni, poznatiji kao fuleroli/fulerenoli ($C_{60}(OH)_n$ $44 \geq n \geq 2$) koji su ratvorljivi u vodi i samim tim prikladniji za biološka ispitivanja. Do sada, u biološkim istraživanjima je najčešće korišćen fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$, simetrični derivat C_{60} (Slika 1B) koji se u vodenom rastvoru nalazi u vidu agregata kao fulerenolske nanočestice (FNP, eng. *fullerenol nanoparticles*) sa raspodelom veličine 15-90 nm i naelektrisanjem koje se u zavisnosti od pH i koncentracije kreće u rasponu od -20 mV do -58 mV (Johnson-Lyles i sar., 2010; Slavic i sar., 2013; Xu i sar., 2013; Borišev i sar., 2016; Vraneš i sar., 2017).



Slika 1. Šematski prikaz strukture A) Fulerena C_{60} (crni krugovi- atomi ugljenika) i B) Fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ (plavi krugovi- atomi ugljenika; crveni krugovi-atomi kiseonika, beli krugovi-atomi vodonika) (preuzeto iz Đorđević i Bogdanović, 2008)

Eksperimentalne i teorijske analize ukazuju da je negativan elektrostatički potencijal molekula fulerenola lociran na atomima kiseonika. Vodonikovi atomi hidroksilnih grupa pokazuju značajne interakcije sa molekulima vode ukazujući na dominantnost vodonične veze, mada se u manjem obimu javljaju i van der Waals-ove interakcije (Maciel i sar., 2011; Vraneš i sar., 2017). Stoga, u vodenim rastvorima molekuli

fulerenola interaguju kako međusobno tako i sa molekulima vode i samoorganizuju se u stabilne FNP. Mreža vodoničnih veza između molekula fulerenola i molekula vode unutar agregata stabilise FNP (Brant i sar., 2007). Teorijskim modelovanjem je ustanovljeno da su najstabilniji mali agregati FNP koji se sastoje od 7 molekula fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ (Piatek i sar., 2011).

Veličina FNP-a zavisi od uslova sredine. Na temperaturama iznad $309,15\text{ }^{\circ}\text{K}$ ($36\text{ }^{\circ}\text{C}$) interakcija između molekula fulerenola slabi i nanočestice su manje, dok se na nižim temperaturama favorizuje stvaranje većih FNP (Vraneš i sar., 2017). Ova osobina FNP-a je od značaja u biološkim istraživanjima s obzirom da se *in vitro* i *in vivo* eksperimenti na sisarima obavljaju na temperaturama između $36\text{-}37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na strukturnu organizaciju FNP-a može uticati i koncentracija fulerenola u vodenom rastvoru. Sa povećanjem koncentracije fulerenola, počevši od 10 mmol/dm^3 , viskozitet eksponencijalno raste kao i veličina FNP-a, dok agregacija ostaje u nanometarskim razmerama (Vraneš i sar., 2017). U vrlo razblaženim rastvorima takođe dolazi do formiranja FNP ali su manje veličine, u proseku 2 nm (Semenov i sar., 2011). Promene pH rastvora takođe utiču na naelektrisanje i rastvorljivost FNP, ali ne utiču značajno na distribuciju veličina. Pri $\text{pH}=3$ naelektrisanje FNP-a je oko nule, dok sa porastom pH vrednosti FNP-a stiče negativno naelektrisanje (Brant i sar., 2007). Fulerenol ima i helatorsku osobinu polidentatnog liganda, te u prisustvu zemnoalkalnih i prelaznih metala gradi precipitate (Anderson i Barron, 2005). Sa druge strane, alkalni metali nemaju uticaja na veličinu FNP-a, što fulerenolu daje prednost u biomedicinskim istraživanjima u kojima se najčešće koristi fiziološki rastvor ($0,9\%$ NaCl) (Djordjevic i sar., 2015).

1.1.2 Hemijske osobine fulerenola

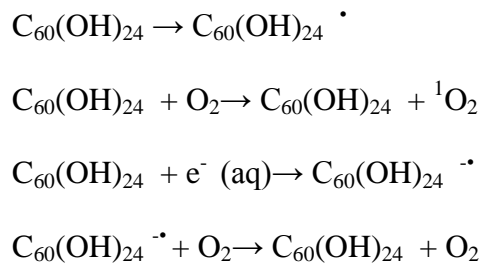
Studije bioloških osobina fulerena C_{60} i njegovih derivata su počele još pre dve i po decenije i predstavljaju važno područje interdisciplinarnih istraživanja (Jensen i Wilson, 1996; Tagmatarchis i Shinohara, 2001; Nakamura i Isobe, 2003; Petrovic i sar., 2015). Fuleren C_{60} je za razliku od grafita i dijamanta veoma hemijski reaktivan i do sada su publikovani brojni naučni radovi koji opisuju njegove različite hemijske reaktivnosti na šta ukazuju brojni sintetisani derivati (Thilgen i Diederich, 1999; Hirsch

i Brettreich, 2005; Cataldo i Da Ros, 2008; Djordjevic i sar., 20015). Karakteristična hemijska osobina fulerena C_{60} je da poseduje delokalizovane π molekulske orbitale koje se protežu kroz celu strukturu kaveza, dok atomi ugljenika predstavljaju kombinaciju sp^2 i sp^3 hibridizacije. Usled toga se sferični fuleren C_{60} ponaša kao elektrodeficijentni alken i brzo reaguje sa različitim polarnim funkcionalnim grupama ili molekulima pri čemu se prevazilazi njegova skoro potpuna nerastvorljivost u vodi i postiže znatna biološka dostupnost (Cataldo i Da Ros, 2008; Grebowski i sar., 2013). Do sada je otkriveno nekoliko puteva sinteze fulerenola sa različitim stepenom hidroksilacije fulerena: $C_{60}(OH)_n$, $2 \leq n \leq 44$, polianjonskih fulerenola $C_{60}(OH)_{15}(ONa)_9$, endohedralnih metalofulerena $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ i drugih fulerenskih derivata (Djordjevic i sar., 2015). Istraživanja na humanim i životinjskim, kako zdravim tako i malignim ćelijskim linijama, su pokazala da fulerenoli poseduju manju, ili čak zanemarljivu, citotoksičnost u odnosu na čist fuleren C_{60} (Sayes i sar., 2004; Isakovic i sar., 2006). Ove studije podržavaju stav da vodo-rastvorne funkcionalne grupe na površini fulerena C_{60} umanjuju njegovu toksičnost (Chavla i Kumar, 2014).

1.1.3 Prooksidativne osobine fulerenola

U zavisnosti od uslova sredine, fuleren i njegovi fulerenolski derivati se mogu ponašati prooksidativno ili antioksidativno.

Jedinstven π elektronski sistem omogućava fulerenima fotosenzitajzerski potencijal nakon apsorpcije ultraljubičastog zračenja ili vidljive polihromatske svetlosti (Vileno i sar., 2004; Isakovic i sar., 2006). Tako su kod fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ u produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta uključena dva tipa fotohemijjskih mehanizama, pri čemu se formiraju singletni kiseonik ($^1O^2$) i superoksid anjon radikal (O_2^-) (Slika 2) (Pickering i Wiesner, 2005; Kong i sar., 2009). U poređenju sa drugim poznatim senzitajzerima, fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ produkuje najmanje dva puta više ROS-a (Pickering i Wiesner, 2005; Lim i sar., 2016).

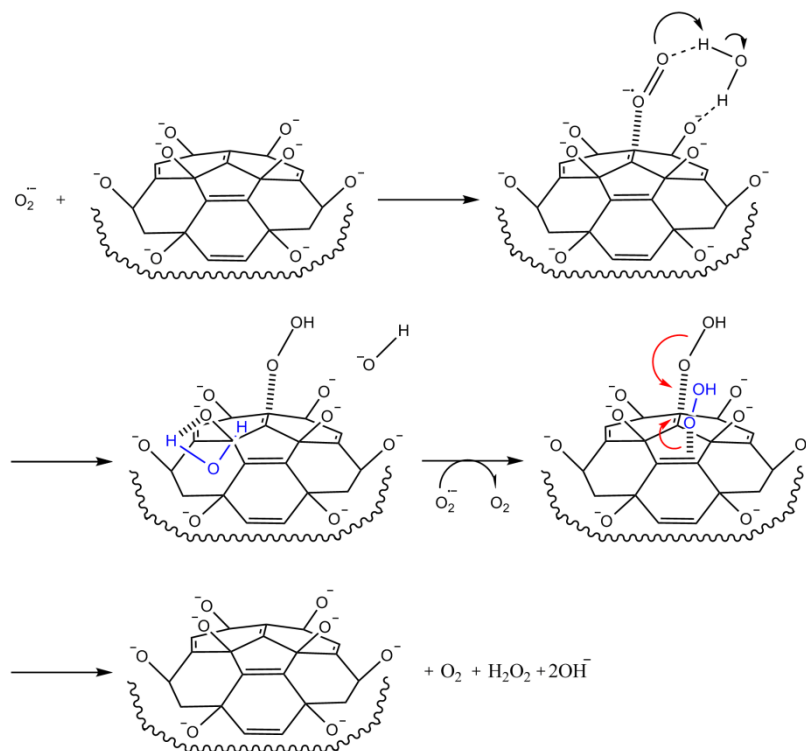


Slika 2. Potencijalni reakcioni mehanizam nastanka ROS-a preko fotosenzitizacije fulerenola $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$

1.1.4 Antioksidativne osobine fulerenola

Fulerenoli pokazuju jaku antioksidativnu aktivnost kako *in vitro* tako i *in vivo* (Markovic i Trajkovic, 2008; Sachkova i sar., 2017; Chen i sar., 2019) i predloženo je nekoliko mehanizama antioksidativnog delovanja FNP-a. Spektroskopija rezonance elektronskog spina (ESR, eng. *electron spin resonance*) je pokazala da fulerenol ima sposobnost da na dozno-zavisan način inhibira intenzitet ESR signala koji potiče od 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala. Pretpostavlja se da tom prilikom dolazi do radikalsko-adicione reakcije $2n \text{ OH}\cdot$ radikala na olefinske dvostruke veze fulerenolskog jezgra: $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24} + 2n \text{ OH}\cdot$ ($n = 1-12$). Drugi predloženi mehanizam je uklanjanje radikala vodonika iz hidroksilne grupe pri čemu dolazi do formiranja relativno stabilnog fulerenolskog radikala $\text{C}_{60}(\text{OH})_{23}\text{O}\cdot$ (Djordjevic i sar., 2004). Dodatno, hidroksil radikal može oduzeti jedan elektron fulerenolu pri čemu se formiranju radikalski katjoni $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}^+$. Još jedan predloženi mehanizam uzima u obzir brojne slobodne elektronske parove oko kiseonika na fulerenolu, koji imaju veliki kapacitet za formiranje koordinativnih veza sa prooksidativnim metalnim jonima (Anderson i Barron, 2005). U istraživanjima efekata fulerenola na kozijim epididimalnim spermatozoama, kada su izložene toksičnim jonima Fe^{2+} , fulerenol ispoljava svoj antioksidativni efekat i tom prilikom povećava aktivnost antioksidativnih enzima i smanjuje lipidnu peroksidaciju (Murugan i sar., 2002). Autor pretpostavlja da do antioksidativnih efekata fulerenola dolazi na membranskom nivou. Na lipozomima, kao model-sistemu ćelijske membrane, Mirkov i saradnicu su pokazali da FNP sprečava

proces lipidne peroksidacije (Mirkov i sar., 2004). Isti autori su predložili i mehanizam po kome fulerenol uklanja superoksid anjon radikal (Slika 3) i azot oksid radikal.



Slika 3. **Hipotetički mehanizam delovanja fulerenola sa superoksid anjon radikalom** (preuzeto iz Đorđević i sar., 2008)

1.1.5 Biološke aktivnosti fulerenola

Usled svoje sposobnosti da uklanjaju slobodne radikale kao što su superoksidanjon radikal, hidroksil radikal i azot oksid radikal (Djordjevic i sar., 2004; Mirkov i sar., 2004; Yin i sar., 2009, Tang i sar., 2018, Chen i sar., 2019), fulerenoli imaju antiinflamatorne (Roursgaard i sar., 2008; Dragojevic-Simic i sar., 2011; Arifa i sar., 2016), antiapoptotske (Lao i sar., 2009; Misirkic i sar., 2009), radioprotektivne (Trajković i sar., 2007; Bogdanović i sar., 2008; Stankov i sar., 2013), kardioprotektivne (Injac i sar., 2008a; Injac i sar., 2008b; Injac i sar., 2008c; Injac i sar., 2009a; Injac i sar., 2009b; Borović i sar., 2014, Tang i sar., 2018), hepatoprotektivne

(Jacevic i sar., 2017; Injac i sar., 2008c; Li i sar., 2016; Ičević i sar., 2011), neuroprotektivne (Hu i sar., 2010; Zha i sar., 2012) i imunomodulatorne efekte (Liu i sar., 2009; Xu i sar., 2013). Slični protektivni efekti FNP su zapaženi i u plućima i bubrezima pacova (Injac i sar., 2009b; Ičević i sar., 2011, Tang i sar., 2018), a ustanovljeno je da fulerenol ima jednak ili viši nivo antioksidativne aktivnosti u poređenju sa prirodnim proizvodima kao što su vitamini A, C i E (Lu i sar., 1998; Mirkov i sar., 2004; Injac i sar., 2009a; Li i sar., 2016). Pojedina istraživanja ukazuju da FNP može imati i antitumorsku i antimetastatsku aktivnost (Liu i sar., 2009; Jiao i sar., 2010; Tang i sar., 2018). Antitumorski efekti FNP delimično potiču od inhibicije angiogeneze (Jiao i sar., 2010; Kang i sar., 2012). Na primer, $C_{60}(OH)_{22}$ zaustavlja rast humanih pankreasnih ksenografta preko inhibicije ekspresije vaskularnog endotelijskog faktora rasta (Kang i sar., 2012). Slični rezultati su dobijeni i na humanim ksenograftima tumora dojke (Jiao i sar., 2010). Inhibicija angiogeneze uz pomoć $C_{60}(OH)_{16-24}$ je uočena i kod zebra ribica, ksenografta mišijih melanoma B16/F10 kao i kod endotelnih ćelija pupčane vene kod miševa sa transplantom (Chaudhuri i sar., 2009b; Sun i sar., 2016). Usled svoje odlične biokompatibilnosti, istraživanja Genga-a i saradnika sugerišu da se fulerenol može koristiti i u tretmanima onih bolesti gde dolazi do gubitka koštanog tkiva, kao što je na primer osteoporoza (Geng i sar., 2017). Naime, da bi kosti bile zdrave neophodno je održavanje homeostaze između osteoblasta i osteoklasta, koju fulerenol reguliše na dozno-zavisan način inhibirajući preteranu aktivaciju osteoklasta.

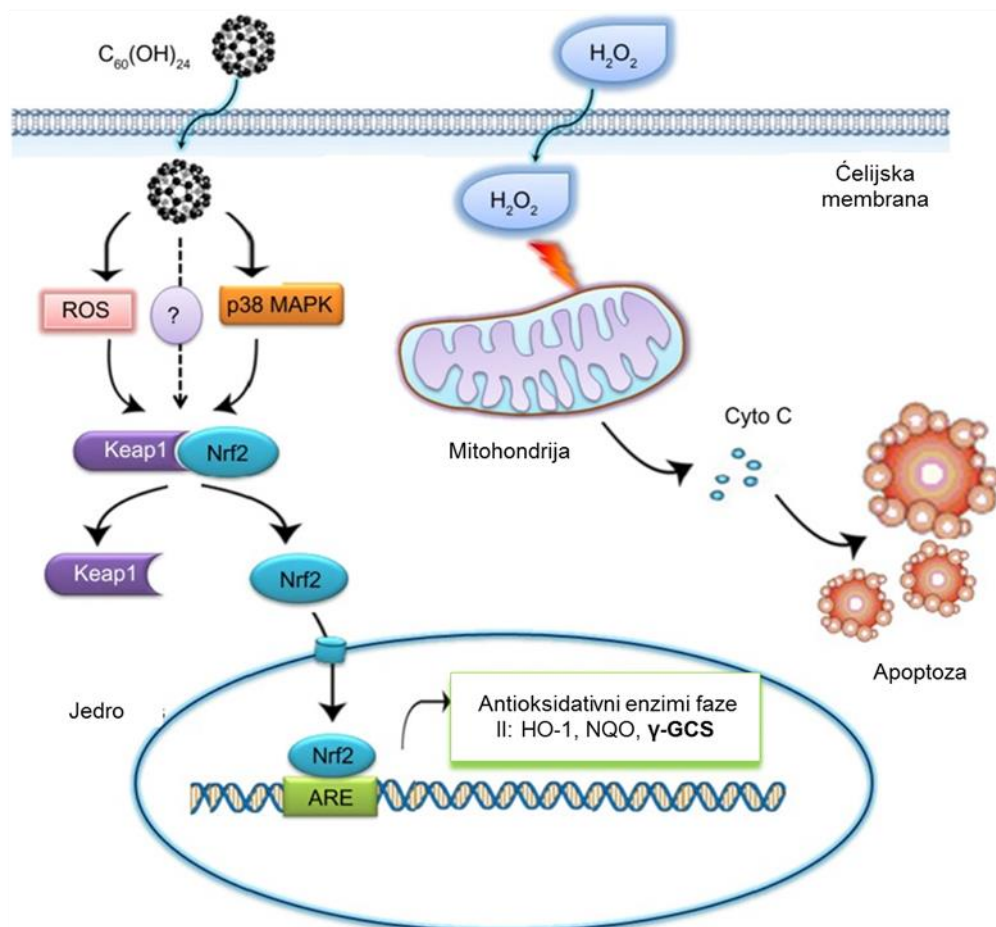
1.1.6 Farmakokinetika fulerenola

Koncentracija obeleženog FNP u mišićima ostaje konstantna dok u krvotoku, plućima, jetri, bubrezima i slezini značajno opada nakon 24 h tretmana jednokratnom primenom $C_{60}(OH)_{24}$ obeleženog tehnejumom-99m (Maksin i sar., 2007; Djordjevic i sar., 2010). Nasuprot tome, koncentracija obeleženog FNP u kostima i pljuvačnim žlezdama značajno raste. Prisutnost relativno visoke radioaktivnosti u jetri, bubrezima i crevima ukazuje da se obeleženi FNP izlučuje putem crevnog i urinarnog trakta. Takođe je istraživana distribucija FNP u različitim organima obolelih od solidnih tumora nakon aplikacije $C_{60}(OH)_{24}$ obeleženog jodom-125 (Ji i sar., 2006). Nakon tri dana od

primene, što predstavlja eliminacioni poluživot FNP-a, i dalje je bilo moguće detektovati veoma visoku količinu obeleženog FNP-a u srcu, jetri, slezini, bubrezima, plućima, kostima i tumorima. Ovaj akumulacioni mehanizam nanočestica se pripisuje fagocitozi od strane mononuklearnih ćelija kao i retencionom efektu. Retencioni efekat je pojava akumulacije nanočestica u tumorskom tkivu usled prisustva velikih fenestracija na krvnim sudovima tumora kao i usled oslabljene limfne drenaže. FNP se iz organizma eliminiše preko bubrega, urinarnom ekskrecijom (Qingnuan i sar., 2002).

1.1.7 Molekularnobiološki mehanizam antioksidativnog delovanja fulerenola

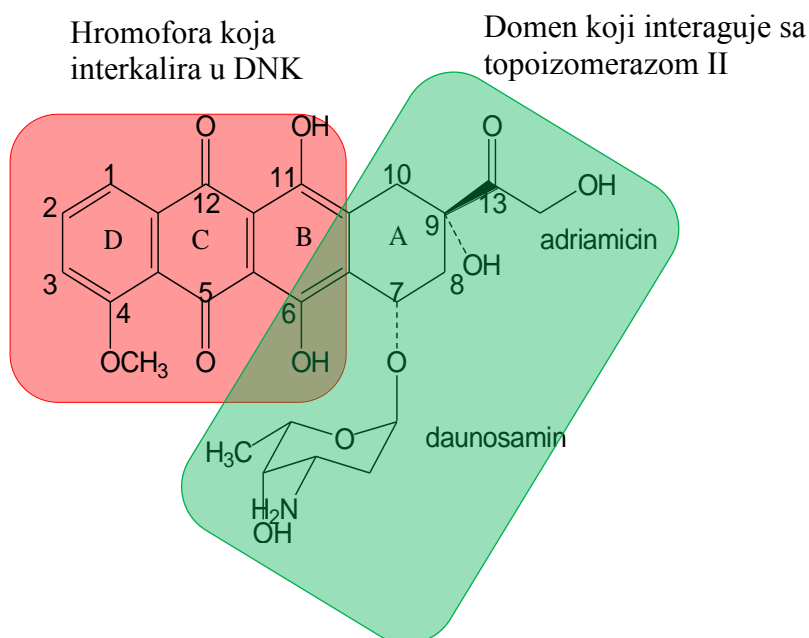
Molekularnobiološki mehanizmi antioksidativnog delovanja FNP-a još uvek nisu u potpunosti rasvetljeni. Poznato je da ključnu ulogu ima transkripcioni faktor Nrf2 (eng. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) koji reguliše ekspresiju nekoliko gena uključenih u antioksidativnu odbranu (Slika 4). Regulacija ekspresije datih gena se odvija vezivanjem Nrf2 za njihove antioksidativne elemente (ARE, eng. *antioxidant response element*) na DNK (deoksiribonukleinska kiselina) modulišući aktivnost antioksidativnih gena. U fiziološkim uslovima, Nrf2 je vezan za represor Keap1 (eng. *Kelch-like ECH-associated Protein 1*) u citoplazmi gde lako podleže degradaciji od strane ubikvitin-proteazomalnog sistema (Wu i sar., 2012). Nakon aktivacije, Nrf2 se otpušta sa Keap1 proteina i translocira u jedro gde gradi heterodimer sa Maf proteinom i biva uključen u transkripcionu mašineriju odgovornu za antioksidativnu odbranu. FNP pojačava translokaciju Nrf2 u jedro humanih ćelija pluća i pojačava ekspresiju grupe antioksidativnih enzima faze II u koju spadaju hem oksigenaza-1 (HO-1), NAD(P)H: hinonoksidoreduktaza 1 i γ -glutamat cistein ligaza (Ye i sar., 2014). Osim toga, FNP učestvuje u fosforilaciji i aktivaciji p38 MAPK (eng. *mitogen-activated protein kinase*) kinaze kao i kinaza regulisanih ekstraćelijskim signalima i c-Jun-N-terminalnih kinaza. Pomenute kinaze fosforilišu Nrf2 i omogućavaju njegovu translokaciju u jedro ćelije (Granado-Serrano i sar., 2012; Rodríguez-Ramiro i sar., 2012; Ye i sar., 2014).



Slika 4. Šematski prikaz hipotetičkog mehanizma zaštite ćelija od vodonik peroksida posredovan fullerlenolom $C_{60}(OH)_{24}$. Transkripcioni faktor Nrf2 reguliše ekspresiju mnogih antioksidativnih enzima. Pretpostavlja se da fullerlenol prolazno povećava intraćelijski nivo ROS i/ili aktivira p38 MAPK signalni put koji može voditi olakšanoj disocijaciji kompleksa Nrf2/Keap. Rezultujuća interakcija Nrf2 sa ARE regulatornim elementima indukuje aktivaciju antioksidativnih enzima faze II pri čemu se pojačava odbrambeni potencijal ćelija od smrti indukovane vodonik peroksidom (preuzeto i modifikovano iz Ye i sar., 2014)

1.2 Doksorubicin

Doksorubicin (DOX, eng. *doxorubicin*) spada u grupu antraciklinskih antibiotika sa antitumorskom aktivnošću i originalno je izolovan iz streptomicete *S. peucetius* var. *caesius*. DOX se na tržištu može naći pod nekoliko komercijalnih naziva: Adriacin[®]; Adriablastin[®]; Adriamycin[®]; Caelyx[®]. Sa kliničke tačke gledišta smatra se najefektivnijim terapijskim agensom koji je ikada razvijen protiv širokog spektra tumora. DOX ima planarnu aromatičnu strukturu i sadrži antrahinonske hromofore i šećernu komponentu, daunosamin (Slika 5) (Forrest i sar., 2012).



Slika 5. **Hemijska struktura DOX-a**
(preuzeto i modifikovano iz Cagel i sar., 2017)

Prva komercijalno dostupna formulacija DOX je bila Adriamycin[®], odobrena od strane američke agencije za hranu i lekove 1974. godine u obliku rastvora doksorubicinhidrohlorid i kao liofilizirani prah doksorubicinhidrohlorid (<https://dtp.cancer.gov/timeline/flash/FDA.htm>). U studiji farmakokinetike DOX-a, izvedenoj na pacijentima sa različitim tipovima solidnih tumora, pokazano je da DOX nakon intravenske aplikacije ima multifaznu distribuciju (Gil i sar., 1983). Inicijalni poluživot DOX-a iznosi u proseku 12 minuta, zatim, 3,3 h, dok je terminalni poluživot

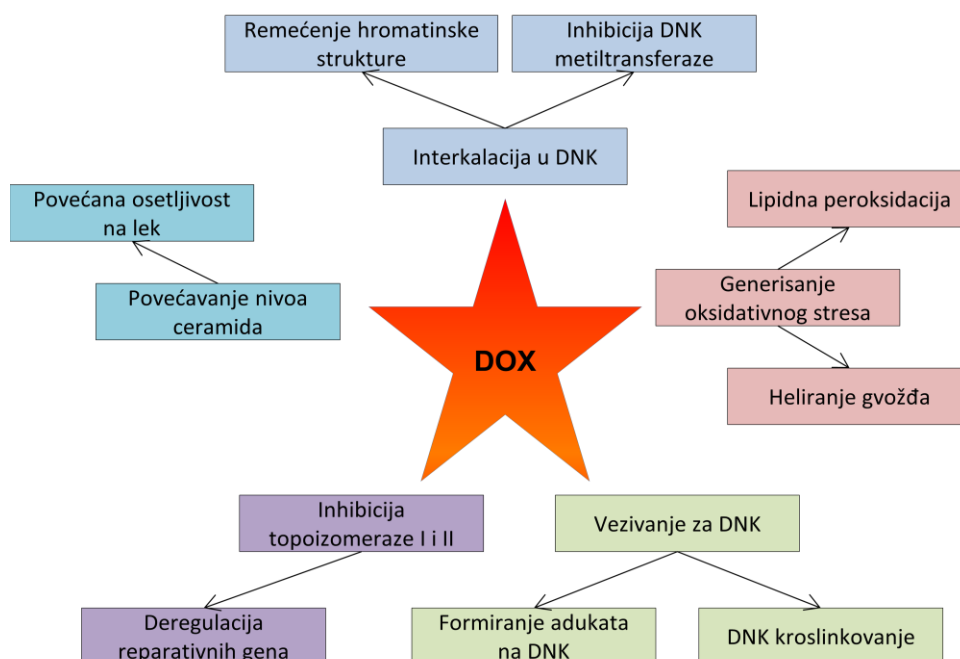
30 h (Barpe i sar., 2010). DOX ima najveći efekat na tkiva i organe u terminalnoj fazi poluživota kada je koncentracija leka niža od 0,1 μ M. Od ukupne koncentracije DOX u plazmi, samo 25% je slobodno dostupno, dok su ostatak DOX-a kao i njegov glavni metabolit, doksorubicinol, vezani za protein seruma, albumin. Glavni putevi izlučivanja DOX-a idu preko metabolizma jetre i žuči. Više od 40% DOX-a je nađeno u žuči tokom pet dana od početka tretmana, dok se samo 5-12% leka i njegovih metabolita pojavljuje u urinu (Greene i sar., 1983).

Glavni limitirajući faktori terapije DOX su višestruka rezistentnost na lekove kao i izražena sistemska toksičnost koja može dovesti do teške mijelosupresije i pojave sekundarnih maligniteta (Bally i sar., 1990). Poseban akcenat se stavlja na kardiotoksičnost (Reeve i sar., 2007; Jing i sar., 2013; Ma i sar., 2013). Direktna rezistencija ćelija na DOX omogućena je njegovim ulaskom u ćelije putem difuzije i detoksikacijom putem metalotioneina i aktivnog transporta van ćelija preko P-glikoproteina (Goren i sar., 2000; Hui i sar., 2008; Lukyanova i sar., 2009). Dodatni faktori koji ograničavaju upotrebu DOX u kliničkoj praksi su: kratak poluživot u ljudskom organizmu, velika količina distribucije i uzan terapijski indeks usled slabe rastvorljivosti u vodenim sistemima (Manivasagan i sar., 2016).

1.2.1 Mehanizam citotoksičnosti DOX-a u tumorskim ćelijama

Do sada je opisano nekoliko molekularnih mehanizama citotoksičnosti DOX koji dovode do smrti ćelija tumora i kojima se ostvaruje njegov terapijski efekat (Slika 6): a) **interkalacija DOX u DNK** dovodi do inhibicije replikacije DNK i ćelijske deobe (Slika 5) (Cutts i sar., 2005; Thorn i sar., 2011; Tacar i sar., 2013). Čak 60% ukupne količine intraćelijskog DOX se nalazi u jedru (Takemura i sar., 2007; Gewirtz i sar.,; Minotti i sar., 2004). Pored jedarne DNK, DOX interkalira i u mitohondrijalnu DNK (Ashley i sar., 2009). DOX pre svega interkalira u regionima DNK bogatim GC baznim parovima, verovatno usled specifičnih vodoničnih veza koje se formiraju između DOX i guanina unutar velikog žljeba B-forme DNK zavojnice (Chaires i sar., 1987; Chaires i sar., 1990; Liao i sar., 2005). Interkalacija DOX u DNK dovodi do remećenja strukture hromatina i torzije DNK i nukleozoma. Odvijanje DNK indukovano DOX rezultuje u pozitivnom torzionom stresu koji destabilizuje

nukleozome (Lee i sar., 1991; Pang i sar., 2013). Tom prilikom se izbacuju pojedini histoni, pojačava obnavljanje nukleozoma i odgovor DNK na stres (Pang i sar., 2013; Yang i sar., 2013). DOX inhibira i katalitičku aktivnost DNK metiltransferaze što dovodi do hromozomske nestabilnosti i deregulacije transkripcije, a krajnji ishod je apoptoza tumorskih ćelija (Jones i Baylin, 2002). DOX može interagovati i sa drugim intraćelijskim proteinima i to posebno sa aminokiselinskim ostacima tirozina i fenilalanina, menjajući njihovu konformaciju, a samim tim i funkciju (Guo i sar., 2009). Destabilizacija hromatina i nukleozoma povećava izloženost DNK različitim agensima i procesima koji je mogu oštetiti i inicirati ćelijsku smrt (Yang i sar., 2013). Interkalacija i vezivanje DOX za DNK dovodi i do formiranja mostova na DNK i kroslinkovanje lanaca DNK (Swift i sar., 2006; Coldwell i sar., 2008; Forrest i sar., 2012). Skoro svi mostovi su udruženi sa guaninom, bilo da se radi o jednolančanoj ili dvolančanoj DNK (Cullinane i sar., 1994). Za kroslinkovanje lanaca DNK su odgovorni guanini unutar GpC ostrvaca (Van Rosmalen i sar., 1995). S obzirom da tokom tretmana samo mala frakcija unetog DOX završi u obliku mostova DNK-DOX, ovaj vid citotoksičnosti ne spada u glavni mehanizam njegovog delovanja (Coldwell i sar., 2008).



Slika 6. Mehanizmi terapijskih efekata DOX-a na tumorske ćelije

b) **DOX generiše oksidativni stres** oksidacijom hinonske strukture do semihinonskih radikala. Novonastali radikal je veoma nestabilan i brzo se konvertuje nazad u DOX dok otpušta reaktivne kiseonične vrste (ROS, eng. *reactive oxygen species*) (Gewirtz, 1999; Šimunek i sar., 2009). ROS su odgovorne za lipidnu peroksidaciju i oštećenje ćelijskih membrana i vode ćeliju u apoptozu (Doroshov, 1986; Dixon i Stockwell, 2014). DOX poseduje i helatorske osobine, te sa gvožđem gradi kompleks koji posreduje u generisanju veoma reaktivnih radikala (Myers, 1998; Swain i Vici, 2004; Ishikawa i sar., 2014). Istraživanje Wang i saradnika je pokazalo da ROS indukovane DOX-om promovišu apoptozu u endotelnim ćelijama i kardiomiocitima aktivacijom NF- κ B (eng. *nuclear factor- κ B*) signalnog puta (Wang i sar., 2001). Međutim, aktivacija istog puta u tumorskim ćelijama, koje su takođe tretirane DOX, inhibira programiranu ćelijsku smrt, ukazujući na različit mehanizam kod zdravih i transformisanih ćelija (Suwei i sar., 2002).

c) **DOX inhibira topoizomerase I i II** čime dovodi do oštećenja DNK tumorskih ćelija (Slika 2) (Tewey i sar., 1984; Foglesong i sar., 1992). Citotoksičnost posredovana TOP IIa podrazumeva deregulaciju gena koji učestvuju u reparaciji DNK, kao što su MSH2 (eng. *mismatch gene 2*) i MLH1 (eng. *MutL homolog 1*) (Fedier i sar., 2001) ili kontroli ćelijskog ciklusa, p53 (eng. *protein 53*) i XPD (eng. *xeroderma pigmentosum group D*) (Robles i sar., 1999).

d) **DOX povećava nivo ceramida**, lipidnog molekula (Lucci i sar., 1999; Delpy i sar., 1999; Kawase i sar., 2002), koji je uključen u zaustavljanje rasta ćelija i apoptozu (Senchenkov i sar., 2001). Ceramid predstavlja okidač za odvajanje CREB3L1 (eng. *cAMP response element-binding protein 3-like 1*) proteina od ćelijske membrane. Na taj način CREB3L1 preuzima ulogu transkripcionog faktora i biva uključen u mehanizme ćelijske osetljivosti na lek. Izmenjena ekspresija gena koji su pod uticajem ovog transkripcionog faktora može doprineti citotoksičnim efektima DOX (Denard i sar., 2012).

1.2.2 Mehanizmi kardiotsičnosti DOX-a

Brojni su mehanizmi putem kojih DOX izaziva kardiomiopatiju (Slika 7). Glavni mehanizam kardiotsičnosti DOX, koji se još naziva i klasičnim mehanizmom kardiotsičnosti, jeste povišen oksidativni stres koji se manifestuje povišenim nivoima ROS i lipidne peroksidacije (Kalyanaraman i sar., 1980; Doroshov 1983; Singal i sar., 1987; Takemura i Fujiwara, 2007; Angsutararux i sar., 2015). Hinonska struktura DOX može biti oksidovana do semihinon radikala dodavanjem jednog elektrona, što je posredovano sa nekoliko NAD(P)H-oksidoreduktaza. Semihinon radikali brzo reaguju sa kiseonikom stvarajući superokside i vodonik peroksid koji prouzrokuju oštećenja na DNK. Kardiotsičnost se pripisuje slobodnoradikalском oksidativnom stresu zasnovanom na gvožđu. DOX ima jak afinitet ka vezivanju gvožđa (Fe^{2+} i Fe^{3+} jona) pri čemu se formira kompleks koji može prouzrokovati lipidnu peroksidaciju interakcijom sa negativno naelektrisanim membranama. Redukcija DOX-a u prisustvu slobodnog gvožđa omogućava otpočinjanje slobodno-radikalskog ciklusa (Myers, 1998). Mayers i saradnici, su predložili model po kome oštećenje eritrocita zavisi od kapaciteta kompleksa da se veže za ćelijsku membranu i proizvede visoku lokalnu koncentraciju ROS, kao što su superoksidi i vodonik peroksid (Myers et. al., 1982). Kompleks DOX-gvožđe može prouzrokovati i degradaciju dezoksiriboze (Gutteridge i sar., 1984). U istraživanjima Linka i saradnika prvi put je pokazano *in vivo*, da do pojačanja antraciklinske toksičnosti može doći usled prevelikog prisustva gvožđa. Autori takođe ističu da mitohondrije predstavljaju glavne mete ove kombinovane toksičnosti (Link i sar., 1996). S obzirom da mitohondrije koriste više od 80% ćelijskog kiseonika, one predstavljaju glavna mesta nastanka ROS (Manoli i sar., 2007). Hidroksil radikal ($\cdot OH$), kao najistaknutiji predstavnik ROS, direktno je odgovoran za oštećenja na DNK. $\cdot OH$ nastaje u reakciji H_2O_2 i O_2^- koja je katalizovana jonima gvožđa preko Haber-Weiss mehanizma (Haber i Weiss, 1932), sa specijalnim slučajem gde je degradacija H_2O_2 posredovana Fe^{2+} jonima (Koppenol, 1993). Fentonova reakcija je kinetički mnogo brža, s obzirom da prelazni metali, kao što su gvožđe i bakar, služe kao katalizatori. Istraživanja na prekomernoj ekspresiji mitohondrijalnog proteina ABCB8, koji olakšava eksport gvožđa, su ukazala da dolazi do smanjenja

mitohondrijalnog gvožđa i ćelijskog ROS, kao i do protekcije kardiomiopatije indukovane DOX-om (Ichikawa i sar., 2014). Međutim, novija istraživanja tvrde suprotno, da preopterećenje gvožđem ne pojačava kardiotoksičnost indukovanu DOX-om, niti kod kardiomiocita *in vitro*, niti kod miševa *in vivo* (Guenancia i sar., 2015). Ovi autori ističu da uloga gvožđa u kardiotoksičnosti indukovanoj DOX-om treba da bude preispitana, čemu je i pristupljeno u ovoj doktorskoj tezi sintetisanjem novog nanokompozita FNP/Fe²⁺ i njegovim ispitivanjem *in vivo*.

Takođe je pokazano da DOX može interagovati sa ćelijskim gvožđem na mnogo kompleksniji način osim produkcije ROS. Kada se DOX veže za Informacionu ribonukleinsku kiselinu (iRNK) koja kodira feritin dolazi do modifikacije ekspresije feritina što utiče na metabolizam i homeostazu gvožđa. Stoga, helatori gvožđa mogu interferirati sa DOX-om na mnogo složeniji način nego što je Fentonova reakcija (Canzoneri i Oyelere, 2008). Sniženi nivoi antioksidanata i sulfhidrilnih grupa (Singal i sar., 1985; Singal i sar., 1987; Doroshov i sar., 1979; Olson i sar., 1980), inhibicija sinteze nukleinskih kiselina i proteina (Arena i sar., 1979; Monti i sar., 1995), oslobađanje vazoaktivnih amina (Bristow i sar., 1980), izmenjena adrenergička funkcija (Tong i sar., 1991) i smanjena ekspresija gena specifičnih za srce predstavljaju dodatne predložene mehanizme kardiotoksičnosti koji mogu delovati kako pojedinačno tako i u kombinaciji (Takemura i Fujiwara, 2007).

DOX ispoljava različite efekte na ekspresiju gena specifičnih za srce, što utiče na strukturu, funkciju i metabolizam srca. Tako su kod miševa kod kojih je indukovana hronična DOX-ska kardiotoksičnost, metodom „cDNK microarray”, identifikovani geni sa izmenjenom ekspresijom, uključujući STAR (eng. *steroidogenic acute regulatory protein*) gene odgovorne za hipertrofiju, SNF1-kinaze (eng. *sucrose non-fermenting 1 protein*, modulare nivoa ATP-a (eng. *adenosine triphosphate*)) i AXUD1 (eng. *Axin-1 up-regulated gene 1*) kao nizvodni target proapoptotskog regulatora AXIN1 (eng. *Axis Inhibition Protein 1*) (Yi i sar., 2006). U sličnom eksperimentalnom modelu detektovane su promene ekspresije gena koje utiču na funkcije mitohondrija, glikolizu i metabolizam masnih kiselina (Berthiaume i sar., 2007).

U ćelijama srca, TOP IIb je glavna forma topoizomeraza koju DOX inhibira formirajući ternarni kompleks: TOP IIb-DOX-DNK. Ovaj kompleks indukuje dvolančane prekide DNK vodeći zaustavljanju ćelijskog ciklusa ili apoptozi, posredstvom transkripcionog faktora p53. Na višim koncentracijama DOX, p53 indukuje apoptozu indukcijom transkripcije Bax gena (Chang i sar., 2011). Do apoptoze indukovane DOX-om može doći smanjenom ekspresijom transkripcionog faktora GATA-4 (transkripcioni aktivator koji se vezuje za konzensusnu sekvencu 5'-AGATAG-3') (Park i sar., 2010) i degradacijom p300 (Poizat, i sar., 2005). GATA-4 omogućava preživljavanje i diferencijaciju postnatalnih kardiomiocita i uzvodni je aktivator antiapoptotskog gena *Bcl-xL* (eng. *B-cell lymphoma-extra large*) (Aries i sar., 2004). Inhibicija aktivnosti GATA-4 proteina indukovana antraciklinima je posredovana inhibicijom transkripcije gena *GATA-4*, pri čemu dolazi do interakcije CBF/NF-Y (eng. *CCAAT-binding factor/nuclear factor-Y*) sa p53 kojom se sprečava vezivanje CBF/NF-Y za CCAAT boks unutar promotorskog regiona gena *GATA-4* (Park i sar., 2010). Transkripcioni koaktivator p300 je uključen u različite ćelijske procese kao što su: regulacija ćelijskog ciklusa, diferencijacija, tumorogeneza, apoptoza (Vo i sar., 2001). U toku apoptoze primarnih neonatalnih kardiomiocita tretiranih DOX-om dolazi do aktivacije p38 kinaza alfa i beta, asociranih sa fosforilacijom p300 (Yuan i sar., 1999). Farmakološka blokada p38 sprečava degradaciju p300. Ponovno uspostavljanje funkcije GATA-4 (Kobayashi i sar., 2010) i p300 (Kawamura i sar., 2004) inhibira smrt kardiomiocita koja je indukovana DOX.

Drugi vid ćelijske smrti koji može biti indukovano DOX-om je nekroza, kojoj prethode oštećenja mitohondrijalne DNK (mtDNK), remećenje integriteta mitohondrijalnih membrana, mitohondrijalna disfunkcija i opadanje nivoa ATP (L'Ecuyer i sar., 2006; Wallace i sar., 2007). Pozitivno naelektrisan DOX se posebno akumulira u mitohondrijama kardiomiocita, najverovatnije usled visokog afiniteta ka negativno naelektrisanom kardiolipinu koji se predominantno nalazi u mitohondrijalnim membranama ćelija tkiva srca (Ichikawa i sar., 2014).

Autofagija, kao treći vid ćelijske smrti, takođe može biti indukovana DOX-om (Kobayashi i sar., 2010). Degradacija ćelijskih konstituenata unutar lizozoma i njihova reciklaža igraju važnu ulogu u obnavljanju kardiomiocita (Terman i Brunk, 2005).

Autofagija može biti pojačana u patološkim uslovima kao što su: hipertrofija srca, dilatacija, miopatija i slabost. Različite studije ukazuju da autofagija može imati dvostruki efekat u tkivu srca koje se nalazi pod stresom: sa jedne strane autofagijom se uklanjaju proteinski agregati i oštećene organele čime se omogućava preživljavanje ćelija i održavanje energetske homeostaze, a sa druge strane prekomeran nivo autofagije može voditi ćelijskoj smrti (Terman i sar., 2008; Zhang i sar., 2009).

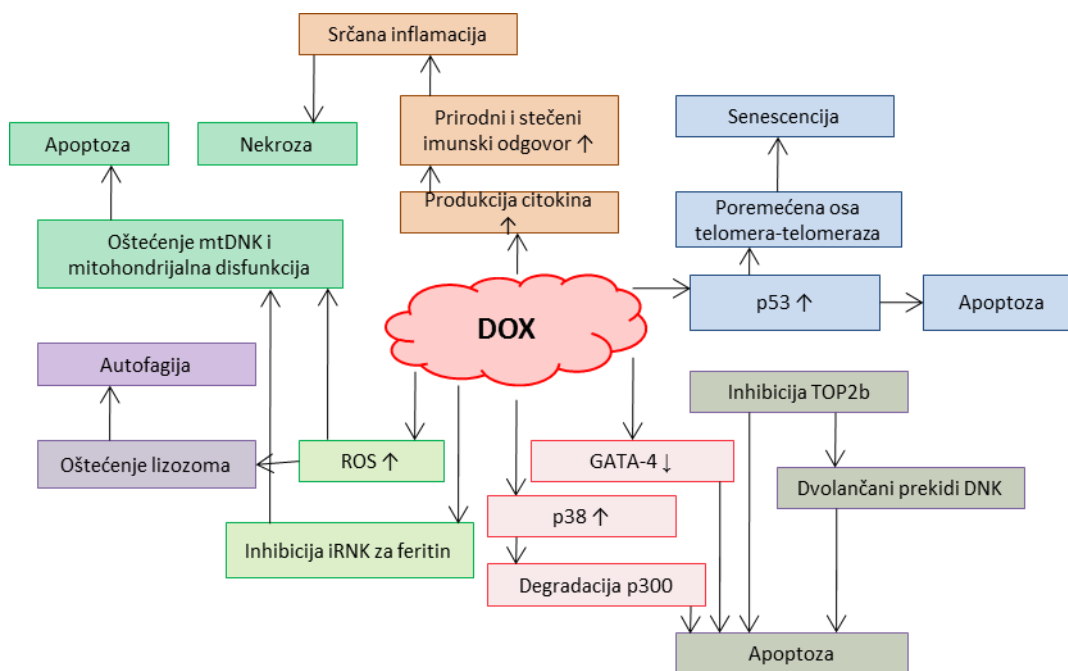
Osim ćelijske smrti, DOX indukuje preranu senescenciju kardiomiocita (Maejima i sar., 2008; Piegari i sar., 2013). Sa starenjem srca dolazi do strukturnih i funkcionalnih promena kardiomiocita koje se najviše odražavaju na mitohondrije i lizosome i asocirane su sa oksidativnim stresom (Kajstura i sar., 2006). Najpouzdaniji marker ćelijske senescencije jeste modifikacija ose telomera-telomeraza, zajedno sa ekspresijom inhibitora ćelijskog ciklusa p16INK4a i p53 (Kajstura i sar., 2006; Bernhard i Laufer, 2008). Neonatalni kardiomiociti tretirani DOX pokazuju karakteristike kardiomiocita starih pacova kao što su povišena ekspresija inhibitorynog proteina ciklin-zavisnih kinaza koji je asociran sa senescencijom, fosforilacija troponina I, smanjena aktivnost telomeraze i acetilacija p53 (Maejima i sar., 2008).

Kardiotoksičnost indukovana DOX može biti udružena i sa inflamacijom. DOX aktivira kako urođeni tako i stečeni imunski odgovor. Može da podstakne produkciju citokina, da poveća aktivnost ćelija „prirodnih ubica“ (Ehrke i sar., 1984), stimuliše odgovor citotoksičnih T limfocita (Maccubbin i sar., 1992) i diferencijaciju makrofaga (Haskill, 1981).

Terapeutske doze DOX aktiviraju i proteazomalni sistem zavisian od ubikvitina. DOX indukuje povećanje aktivnosti ubikvitin ligaza i drugih proteaza i može dovesti do dezintegracije miofibrila, smanjenja kardioprotektivnih/kardiomiocitnih faktora preživljavanja, kao i oštećenja sarkomera (Liu i sar., 2008).

Putevi metabolizma DOX su takođe relevantni kada se govori o kardiotoksičnosti. Doksorubicinol je glavni metabolički produkt DOX-a. Nastaje karbonilnom redukcijom na C-13 što povećava polarnost DOX i samim tim omogućava veću akumulaciju u srcu i duže zadržavanje, povećavajući kardiotoksičnost. Doksorubicinol je mnogo potentniji

od DOX u inhibiciji kalcijumske pumpe na sarkoplazmatičnom retikulumu, Na⁺/K⁺ pumpe na sarkolemi kao i FoF' protonske pumpe na mitohondrijama (Olson i sar., 1988). Poznato je i da doksorubicinol interaguje sa tiolnim grupama proteina, doprinoseći oštećenju ćelija (Blanco i sar., 2008). Sa druge strane, akutno dejstvo DOX kod pacova povećava ekspresiju nekoliko citohrom P450 enzima, a kao posledica nastaju promene u metabolizmu arahidonske kiseline koje vode progresivnoj kardiotoksičnosti (Zordoky i sar., 2010).



Slika 7. **Mehanizmi uključeni u nastanak kardiomiopatije indukovane DOX-om** (p53-protein 53, TOP2b- topoizomeraza 2 beta, p38-protein 38, ROS-reaktivne kiseonične vrste, GATA-4 - transkripcioni faktor)

Do akutne DOX-ske kardiotoksičnosti dolazi tokom prva 2-3 dana nakon njegove primene. Učestalost akutne DOX-ske kardiotoksičnosti u proseku iznosi 11% (Swai i sar., 2003; Takemura i Fujiwara, 2007) i manifestuje se kao bol u grudima usled mioperikarditisa i/ili kao lupanje srca usled sinusne tahikardije. Mehanizam akutnih promena nije u potpunosti jasan i može biti posledica edema miokarda indukovanog DOX koji je reverzibilan (Singal i sar., 1987; Takemura i Fujiwara, 2007). Akutno otkazivanje leve komore srca je retko ali je takođe i reverzibilno ukoliko se primeni odgovarajuća terapija. Učestalost hronične DOX-ske kardiotoksičnosti je mnogo niža i procenjuje se na oko 1,7% (Von Hoff i sar., 1979) i obično se manifestuje u roku od 30

dana nakon primenjene poslednje doze DOX, ali se može pojaviti čak i 6-10 godina nakon završene terapije. Učestalost DOX-ske kardiomiopatije je primarno povezana sa njegovom dozom i iznosi oko 4% kada je doza 500-550 mg/m², 18% kada je doza 551-600 mg/m² i 36% kada doza dostigne 600 mg/m² (Lefrak i sar., 1973). U ostale rizične faktore spadaju kombinovane terapije sa drugim kardiotoksičnim antitumorskim lekovima kao i mediastinalna radijaciona terapija. Terapija tumora (posebno hemioterapija) u detinjstvu i adolescenciji dodatno predstavlja predispoziciju za razvoj DOX-ske kardiomiopatije u adultnom dobu (Broder i Gottlieb 2008). Od značaja je i starosno doba pacijenata koje može imati uticaja na rizik od razvoja prethodno navedenih komplikacija i njima su podložniji kako veoma mladi tako i veoma stari ljudi. Takođe, istorija kardiovaskularnih bolesti pre terapije predstavlja rizičan faktor za razvoj komplikacija (Von Hoff i sar., 1979).

Osnovno pitanje koje se nameće je, zašto je toliko značajno posebno zaštititi srce tokom primene leka, kada DOX izaziva sistemsku toksičnost organizma. Adultno srce čoveka ima minimalan kapacitet regeneracije. Kardiomiociti se ne dele jer su terminalno diferencirani i većina zrelih kardiomiocita se nalazi u G0 ili G1 fazi ćelijskog ciklusa. Smatra se da populacija kardiomiocita ostaje brojčano konstantna sa odnosom 1:1 sa mikrokapilarima koji dopremaju kiseonik i hranljive materije (Rakusan i sar., 1993). Konstantan stres dovodi do ultrastrukturnog remodelovanja kod koga smrt kardiomiocita prevazilazi njihovo obnavljanje, što rezultira pogresivnim oštećenjem srca. Skorija istraživanja su otkrila da kardiomiociti sisara zadržavaju određeni kapacitet za deobu, a identifikovane su i progenitorske ćelije srca (Leri i sar., 2011).

Sa druge strane, srce je posebno podložno oksidativnom oštećenju usled specifične biologije kardiomiocita. Naime, važni izvori ROS su prisutni u miokardijumu (Rochette i sar., 2011) i paradoksalno, antioksidativna odbrana je manje aktivna u srcu nego u drugim organima, kao što je na primer jetra. Aktivnosti tri enzima (superoksid dismutaza (SOD), katalaza, i glutation peroksidaza (GPx) sposobna da detoksikuje aktivirani kiseonik je prisutna kako u srcu tako i u jetri. Međutim srce sadrži 150 puta manje katalaze i približno četiri puta manje SOD nego jetra, dok je aktivnost GPx-a slična u oba tkiva (Doroshov i sar., 1980; Noeman i sar., 2011). U miokardijumu, kao i

u nekim drugim tkivima, radikalske reakcije, u prisustvu superoksid anjon radikala ili singletnog kiseonika, sa pojedinim aminokiselinama, peptidima i proteinima daju hidroperoksida. Ove kiseonične vrste efikasnije oštećuju i inaktiviraju proteine od vodonik peroksida. Mogu se detektovati kod kardiomiocita i slabo se uklanjaju enzimatskim putem (Gracanin i sar., 2007). Iako je jasno pokazano da ROS utiču na kontraktilnost srca, studije njihovih efekata na ekscitabilnost srca su ograničene. Ekscitabilnost srca zavisi od funkcije različitih jonskih kanala kako na sarkolemi tako i na mitohondrijama koji obezbeđuju ćelijsku jonsku homeostazu. ROS menjaju funkciju nekoliko unutrašnjih i spoljašnjih kalijumovih i kalcijumovih kanala, utičući na ćelijski potencijal u mirovanju kao i na morfologiju akcionog potencijala srca. Redoks balans reguliše ekscitabilnost srca i u patološkim uslovima i može izmeniti akcioni potencijal vodeći slabosti srca (Gao i sar., 1996; Terman i sar., 2010). Mehanizmi otkazivanja funkcije srca su višestruki i kompleksni a jedan od važnih faktoraje disfunkcija mitohondrija. Kod kardiomiocita, mitohondrije se nalaze u blizini sarkoplazmatičnog retikuluma i mogu prihvatiti veliku količinu oslobođenog kalcijuma (Dorn i Maack 2013). Endoplazmatični retikulum i motohondrije predstavljaju osnovni izvor slobodnih radikala. Mitohondrije predstavljaju glavne regulatore redoks metabolizma i ćelijske energije. Nekoliko procesa, uključujući redoks zavisnu sintezu ATP putem oksidativne fosforilacije i produkcije ROS, odigrava se u mitohondrijama. Kada produkcija ROS prevaziđe lokalni kapacitet detoksikacije, dolazi do oksidativnih oštećenja mtDNK, proteina i membranskih lipida (Camara i sar., 2011). U fiziološkim uslovima, procenjuje se da na produkciju ROS odlazi 2-5% ukupnog unosa kiseonika u organizam. Oksidativni stres u kombinaciji sa kalcijumskim opterećenjem i opadanjem ATP indukuje mitohondrijalnu permeabilnu tranziciju i formiranje patoloških, nespecifičnih pora vodeći ćelijskoj smrti (Javadov i Kuznetsov, 2014). Specifična azot oksid (NO) sintetaza je takođe lokalizovana u mitohondrijama srca (Kanai i sar., 2001). Generisanje superoksid anjon radikala i azot oksid radikala može dovesti do produkcije veoma reaktivnog peroksinitrita koji kod proteina izaziva S-nitrozilaciju kao i nitrovanje tirozina. Na taj način dolazi do oksidacije proteina i oštećenja DNK koja uključuju prekidanje lanaca i modifikaciju baza. Tom prilikom se aktivira nuklearni enzim PARP (eng. *poly-ADP ribose polymerase*), rezultujući u opadanju energije i indukujući apoptozu ili nekrozu ćelija (Ahmadi sar., 2009). Endoplazmatični retikulum

takođe učestvuje u savijanju sekretornih i membranskih proteina, u homeostazi kalcijuma i biosintezi lipida (Ron i Walter, 2007). Redoks disbalans izazavan hemioterapeutskim lekovima vodi akumulaciji nesavijenih ili pogrešno savijenih proteina u lumenu endoplazmatičnog retikuluma što utiče na ćelijske funkcije i može voditi ćelijskoj smrti (Bravo i sar., 2013).

1.2.3 Mehanizmi hepatotoksičnosti DOX-a

Tokom terapije doksorubicinom, pored srca, strada i jetra. S obzirom da je jetra odgovorna za mnoge fiziološke funkcije, kao što su: detoksikacija organizma, biotransformacija lekova i njihova konverzija u forme koje se lakše eliminišu iz organizma, oštećenje njene funkcije je od ključnog značaja. U proseku, kod 30% -40% pacijenata koji primaju DOX intravenozno, dolazi do povećanja nivoa serumskih biomarkera funkcije jetre (Yang i sar., 2002; Damodar i sar., 2014). Korišćenje DOX u terapijske svrhe povećava rizik od razvoja akutne/subakutne nekroze jetre, hepatitisa i hepatične kome, kod svih tipova kancera, za 1,29x. (El-Sayyad i sar., 2009; Bhandari i sar., 2016).

Do danas, mehanizmi koji leže u osnovi DOX-ske hepatotoksičnosti, nisu do kraja razjašnjeni. Smatra se da je oksidativni stres glavni medijator kod hepatotoksičnosti indukovane DOX-om (Alshabanah i sar., 2010; Pieniżek i sar., 2013; Wided i sar., 2014; Mokni i sar., 2015; Mansouri i sar., 2017). U jetri, DOX se metaboliše do doksorubicinola i drugih citotoksičnih metabolita (Ballet i sar., 1987). Poznato je da doksorubicinol interaguje sa tiolnim grupama proteina prouzrokujući na taj način intenzivna oštećenja ćelija (Octavia i sar., 2012). Tokom oksidativnog stresa, dolazi do produkcije i eliminacije ROS kao i smanjene produkcije antioksidanata. ROS može da aktivira stelatne ćelije u jetri izazivajući fibrozu i/ili cirozu. Mitohondrije, mikrozomi i peroksizomi u parenhimu, endotelne i Kupferove ćelije, mogu biti oštećeni od strane ROS što vodi inflamaciji i nekrozi kao i hroničnom hepatitisu. Istraživanja zasnovana na transmisioj elektronskoj mikroskopiji su pokazala da tokom DOX-ske aplikacije dolazi do morfoloških promena u hepatocitima u vidu bubrenja i vakuolizacije mitohondrija, piknoze jedra i dilatacije intraceluranog prostora (Kalender i sar., 2005). Tokom metaboličke aktivacije DOX-a, mogu nastati i bezkiseonični slobodni radikali,

koji mogu imati toksične efekte na hepatocitima usled smanjenog nivoa antioksidativnih enzima u tkivu jetre, kao što su katalaza, SOD i GPx (Singla i sar., 2014). Spoljašnji i unutrašnji apoptotski putevi posredovani Fas ligandom i Bax proteinom, takođe mogu voditi ka akutnim toksičnim efektima DOX u tkivu jetre (Nagai i sar., 2016). Dokazano je da indukcija inflamatorne kaskade ima značajnu ulogu u patogenezi hepatotoksičnosti prouzrokovane DOX-om (Gao i sar., 2016). Naime, DOX indukuje ekspresiju proteina uključenih u akutnu fazu inflamacije kao što su: C-reaktivni protein i proinflamatorni citokini: factor nekroze tumora alfa (eng. *tumor necrosis factor alpha (TNF- α)*) i interleukun 6 u Kupferovim ćelijama, vodeći disfunkciji jetre (Dent, 2013).

1.2.4 Prevencija kardiotoksičnosti i hepatotoksičnosti indukovane DOX-om

Do sada je predloženo nekoliko strategija za prevenciju kardiotoksičnosti. Najefektivniji način bi bio da se u potpunosti zaobiđe upotreba antraciklina ukoliko bi bilo moguće dokazati da nemaju značajnu efikasnost u lečenju tumora. I mada ne postoji sigurna doza, jedna od opcija je da se ograniči kumulativna antraciklinska doza. Različite strategije razmatraju duže vreme infuzije antraciklina kao i korišćenje različitih antraciklinskih analoga. I ako neke od ovih strategija mogu biti obećavajuće kod odraslih pacijenata, kvalitetni pomaci u pedijatriji još uvek nedostaju (van Dalen i sar., 2009; van Dalen i sar., 2010). Još jedan pristup u prevenciji kardiotoksičnosti uključuje korišćenje kardioprotektora kao što su deksrazoksan, N-acetilcistein, L-karnitin i SOD, koji smanjuju oksidativni stres izazvan DOX (van Dalen i sar., 2011; Lipshultz i sar., 2005). Međutim, upotreba ovih protektora takođe nije bez rizika. Tako je deksrazoksan udružen sa pojavom sekundarnih malignih neoplazmi, i stoga je neophodno pri donošenju odluke o njegovoj upotrebi izvagati rizik od pojave kardiotoksičnosti usled primene antraciklinskih lekova i pojave drugih oblika štetnih efekata izazvanih protektorom (Shaikh i sar., 2016).

Na polju prevencija toksičnosti jetre nije učinjeno mnogo i ona, za sada, obuhvata optimizaciju doze i suplementiranje antioksidantima. Do danas, u profilaktičke svrhe od

DOX indukovane hepatotoksičnosti, nije predložen, niti odobren, ni jedan hepatoprotektivni agens (Damodar i sar., 2014; Grigorian i O'Brien, 2014).

1.2.5 Gvožđe, njegova uloga u metabolizmu i homeostaza

Gvožđe je esencijalni element brojnih fundamentalnih metaboličkih procesa u ćelijama i organizmima. Nedostatak gvožđa je najčešći uzrok anemije kod ljudi i predstavlja globalni zdravstveni problem, a ogleda se u prisustvu niskog broja malih (mikrocitnih) i hipoferemičnih eritrocita. Pored uloge u eritropoezi, gvožđe je neophodno za funkcionisanje mitohondrija, DNK sintezu i reparaciju, kao i mnoge enzimske reakcije uključene u preživljavanje ćelija (Camaschella, 2015). Prekomerno prisustvo gvožđa u organizmu je takođe uobičajen problem u ljudskoj populaciji i jednako opasan, oštećujući parenhimalne organe, kao što su: jetra, srce i pankreas (Pietrangelo 2016).

Ključ sistemskog dopremanja gvožđa i njegova homeostaza leže u regulaciji njegovog adekvatnog nivoa u krvnoj plazmi. Gvožđe cirkuliše kroz krvnu plazmu vezano za glikoprotein transferin, koji poseduje dva visoko afinitetna vezujuća mesta za Fe^{3+} . Transferin, vezujući za sebe Fe^{3+} , ostaje u stabilnoj solubinoj formi, služeći kao glavni prenosilac gvožđa do ćelija preko transferinskog receptora (TfR1), i ograničava stvaranje toksičnih slobodnih radikala (Gkouvatsos i sar., 2012). Kod čoveka, transferin je u krvnoj plazmi saturisan sa oko 30% Fe^{3+} . Parametar saturacije se uzima kao pokazatelj da li u organizmu postoji deficit ili suficit gvožđa. Kada saturacija transferina padne ispod 16%, to ukazuje na nedostatak gvožđa, a kada saturacija prekorači granicu od 45%, onda je to znak da postoji preopterećenje gvožđem. U situacijama kada saturacija pređe 60%, gvožđe koje nije vezano za transferin počinje da se akumulira u cirkulaciji i da oštećuje ćelije parenhima jetre, srca i pankreasa (Hentze i sar., 2010; Pietrangelo, 2016).

Homeostatski sistem ima ulogu da održi saturaciju transferina na fiziološkom nivou, reagujući na signale, iz signalnih puteva koji koriste gvožđe, kao što je npr. eritropoeza, i obaveštavaju ćelije koje dopremaju gvožđe u krvotok. Gvožđe se oslobađa u cirkulaciju iz duodenalnih enterocita, koji absorbuju 1–2 mg hranom unesenog gvožđa u toku dana, kao i iz makrofaga, koji recikliraju 20–25 mg gvožđa iz senescentnih

eritrocita (Donovan i sar., 2000). Hepatociti igraju dvostruku ulogu u sistemskom metabolizmu gvožđa: oni su glavna mesta gde se gvožđe skladišti ili odakle se ekskretuje po potrebi, s jedne strane, i sa druge strane, hepatociti sekretuju regulatorni hormon hepcidin koji cirkuliše u plazmi vezan za alfa-2- makroglobulin (Peslova i sar., 2009). Hepcidin kontroliše nivo gvožđa u krvnoj plazmi tako što se vezuje za ferroportin (protein membrane koji vrši eksportovanje gvožđa na površinu ćelija kada je gvožđe u deficitu) i pokreće njegovu degradaciju, što posledično ima efekat na smanjenje eksportovanja gvožđa, kada je ono prisutno u višku, i samim tim sprečava se preopterećenje transferina (Nemeth i sar., 2004).

Makrofazi takođe imaju značajnu ulogu u održavanju adekvatnog nivoa gvožđa u plazmi. S obzirom da se manje od 10% dnevnih potreba za gvoždem unese apsorpcijom preko hrane, ostatak se nadoknađuje uz pomoć makrofaga koji recikliraju gvožđe (Soares i Hamza 2016).

Gvožđe iz hrane se apsorbuje na granici gde su mikrovili duodenalnih enterocita u kontaktu sa sadržajem creva, preko dvovalentnog metalnog transportera 1 (eng. *divalent metal transporter 1*, *DMT1/SLC11A2*, *solute carrier family 11, member 2*) (Gunshin i sar., 1997). Kako se gvožđe, uglavnom, u hrani nalazi u oksidovanom stanju, prvo se vrši njegova redukcija uz pomoć ferireduktaze DcytB (eng. *Duodenal cytochrome B*) smeštene u membrani mikrovila. Gvožđe u obliku hema se apsorbuje nezavisnim, do kraja nerazjašnjenim mehanizmom, jer transporter SLC46A1 uglavnom nosi folat (Qiu i sar., 2006). Heme se oslobađa intracelularno uz pomoć hemoksigenaze, i to najčešće inducibilne hemoksigenaze 1 (HOX1, eng. *hemoxygenase 1*) (Ferris i sar., 1999). Potom, gvožđe se iz citoplazme enterocita, eksportuje u krvnu plazmu bazolateralnim eksporterom gvožđa, ferroportinom (Donovan i sar., 2000). Eksport gvožđa preko ferroportina zahteva prisustvo hefestina, višebakarne oksidaze, koja oksiduje Fe(II) do Fe(III) da bi mogao da se zakači na transferin (Petrač i Vyoral, 2005).

Transferin-Fe²⁺ je glavni izvor gvožđa u ćelijama sisara, koga one usvajaju preko visoko afinitetnog transferinskog receptora 1. Kompleks transferin-receptor se

internalizuje endocitotskim klatrinskim vezikulama. Acidifikacija koja potom sledi u ranom endozomu, aktivira konformacione promene i kod transferina i kod receptora i dolazi do otpuštanja gvožđa (Dautry-Varsat i sar., 1983). Oslobođeno gvožđe se redukuje do Fe(II) od strane metaloreduktaze STEAP (Ohgami i sar., 2006) za transport u citoplazmu preko DMT1. DMT1 ima dvostruku ulogu u metabolizmu gvožđa, kao apikalni membranski protein enterocita koji posreduje u sistemske apsorpciji gvožđa, kao i sveprisutan endozomalni protein uključen u transport gvožđa iz endozoma u citosol. Apo-transferin i receptor se recikliraju vraćajući se nazad na površinu ćelije.

Pored unosa gvožđa putem transferina u ćelije, postoji i put nezavisan od njega, koji se oslanja na različite transportere metala (Knutson 2019), kao što je npr. ZIP14. Serumski feritin ulazi u ćelije putem Scara5 i TIM-2, feritinskih receptora (Chen i sar., 2005; Li i sar., 2009). Specijalizovane ćelije su u mogućnosti da usvoje gvožđe i u obliku hema putem SLC48A1 importera (Rajagopal i sar., 2008). Ćelije hem usvajaju i indirektno, tako što makrofazi fagocituju umiruće eritrocite i tako dolaze do hema.

Eksport gvožđa je drugi bitan proces u održavanju homeostaze gvožđa i vrši se iz mnogih ćelija (makrofaga, duodenalnih enterocita i drugih). Ćelije koje eksportuju gvožđe sadrže relativno visok nivo feroportina (SLC40A1) (Donovan i sar., 2005). Pored oslobađanja gvožđa putem feroportina, ćelije mogu eksportovati gvožđe i u formi hema koje ide preko FLVCR1 proteina (Keel i sar., 2008).

Gvožđe koje je dospelo u citoplazmu ćelije, a koje nije iskorišćeno u reakcijama metalacije ili eksportovano van ćelije, skladišti se putem feritina koji spada u grupu heteropolimernih proteina sačinjenih od 24 subjedinice teških (FtH1) i lakih lanaca (FtL) (Arosio i Levi 2010). Obe subjedinice feritina su sveprisutno eksprimirane, međutim, stepen njihove ekspresije varira u zavisnosti o tipa ćelija kao i od odgovora na stimuluse kao što su inflamacija ili infekcija. FtH1 ima ferooksidaznu aktivnost koja je neophodna za deponovanje gvožđa unutar nanokaveza proteina feritina, dok subjedinica FtL olakšava nukleaciju gvožđa i povećava promet ferooksidaznog mesta. Malo je poznato kako se gvožđe ekstrahuje iz labilnog citoplazmatskog pula i dostavlja u feritin. Istraživanja su pokazala da je poli(rC)-vezujući protein 1 (PCBP1) neophodan

molekularni šaperon za dopremanje gvožđa u feritin (Philpott i sar., 2017). PCBP1 je inače, najviše poznat po svojoj ulozi u posttranskripcionoj regulaciji, kao RNK-vezujući protein. Kako se gvožđe „kreće” unutar ćelije predstavlja nepoznanicu koja tek treba da bude razjašnjena. U citoplazmi, gvožđe je prisutno u proteinima koji za sebe vezuju dva jona gvožđa, kako što su ribonukleotidne reduktaze (Cooper i sar., 1996), međutim, većina gvožđa odlazi u mitohondrije gde se inkorporira u bioaktivne grupe hem i Fe/S prostetičke klastere koji učestvuju u elektron-transportnom lancu (Gille i Reichmann, 2011).

1.2.6 Nanoformulacije DOX-a i mehanizmi njegovog delovanja

Još je 1992. godine postavljeno pitanje hoćemo li ikada pronaći bolji DOX (Weiss 1992), a kao odgovor se nude nanoformulacije lekova (Liang i sar., 2010; Cagel i sar., 2017). U protekle dve decenije razvijeni su brojni nanodostavni sistemi za DOX koji se baziraju na: lipozomima, polimernim micelama, dendrimerima, peptidnim konjugatima, kitozanskim konjugatima, čvrstim lipidima, nanoemulzijama, ciklodekstrinima, magnetnim, zlatnim, silikatnim i ugljeničnim nanočesticama (Rusetskaya i sar., 2009; Chaudhuri i sar., 2009a; Yousefpour i sar., 2011; Ma i sar., 2013; Yu i sar., 2015; Tang i sar., 2018; Jahangirian, 2019). Nanonosači omogućavaju kontinuirano oslobađanje aktivne forme DOX unutar ćelija osiguravajući na taj način njegovu efektivnu koncentraciju duži vremenski period (Chaudhuri i sar., 2009a; Lentacker i sar., 2010; Seynhaeve i sar., 2013). Međutim, nanonosači imaju i svoja ograničenja kao što su: nestabilnost, strukturna heterogenost, varijabilnost oblika i veličine, složena sinteza i separacija, smanjenje efikasnosti leka. Stoga postoji potreba za unapređenjem nanonosača kod kojih bi oblik, veličina, distribucija, funkcionalizacija i kapacitet za prenos leka bili precizno podešeni i samim tim biološki podesniji (Geng i sar., 2007). Već duži niz godina u kliničkoj praksi je u upotrebi lipozomalna nanoformulacija DOX koja se na tržištu nalazi pod različitim imenima: Doxil[®], Caelyx[®], Myocet[®], Lipo-dox[®], Nudoxa[®] usled neznatnih razlika u veličini i hemijskom sastavu lipozoma. Nasuprot njima, lipozomalni ThermoDox[®], kao i micelarni SP1049C su u III fazi kliničkih ispitivanja, dok su konjugati leka i polimera kao što su PK1, PK2 i micelarni NK19 još uvek u II fazi kliničkih studija (Schütz i sar., 2013; Rivankar, 2014). Navedene nanoformulacije lekova su pokazale poboljšanje kako u farmakokinetici tako i u

toksikološkom profilu u poređenju sa konvencionalnim DOX. Međutim, daleko od toga da su idealne. Dok su pojedini štetni efekti nestali ili su redukovani, novi su se pojavili (Chan i sar., 2004; Fan i Zhang, 2013). Takođe, došlo je i do fundamentalnih promena u pristupu lečenja pacijenata. Sa konvencionalne i generalizovane terapije prešlo se na pristup u kome su genom i imunološki odgovor pacijenta okosnica za primenu poboljšanih terapeutika, koji se baziraju na targetovanju i efikasnijim nanotehnološkim platformama (Cagel i sar., 2017).

Uprkos brojnim istraživanjima, molekularni mehanizmi nanoformulacija DOX na ćelijskom i subćelijskom nivou su slabo rasvetljeni. Predložena su dva mehanizma kako Doxil[®] ulazi u tumorske ćelije *in vivo*: a) Lipozomi Doxil[®] bivaju uneti od strane ćelija i lek se otpušta unutar ćelija ili b) DOX se prvo oslobađa iz lipozoma u intersticijalnoj sredini tumora, odakle ulazi u ćelije kao slobodan lek (Barenholz i sar., 2012). Brzina unosa slobodnog DOX je kombinacija linearne difuzije i komponente posredovane nosačem (Bates i sar., 1985; El-Kareh i Secomb, 2005). Unutar ćelija slobodni DOX je distribuiran u citoplazmi i jedru, dok nanočestice većinom ulaze endocitozom i akumuliraju DOX u citoplazmi (Dai i sar., 2008; Liu i sar., 2010; Jiang i sar., 2013). Ovo prostorno nepodudaranje najverovatnije odslikava različite mehanizme delovanja DOX. Naime, DOX u formi nanokonjugata sa koga se ne može otpustiti indukuje ćelijsku toksičnost preko efekata na ćelijskim membranama i nekrozu (Hovorka i sar., 2002). Ukoliko se kovalentna veza između leka i polimera (nanonosača) lako prekida unutar ćelije, oslobođeni DOX može da uđe u ćelijsko jedro i izazove apoptozu (Omelyanenko i sar., 1998; Kopečková i sar., 1998; Minko i sar., 2001; Malugin i sar., 2007). Kovalentna konjugacija leka za nanonosač sprečava nepravovremeno otpuštanje leka u krvotoku, pre nego što stigne na ciljno mesto. Iz tog razloga kovalentne modifikacije imaju prednost u odnosu na inkapsulaciju leka (Yousefpouri sar., 2011). Treba imati na umu da interakcija između DOX i nanonosača, a koja može biti aditivna, sinergistička, antagonistička ili neutralna, određuje efikasnost DOX i mehanizam njegovog delovanja (Yousefpour i sar., 2011; Jiang i sar., 2013).

Jednom kada DOX dospe u unutrašnjost tumorske ćelije, krajnji cilj jeste da u njoj ostane i usmrti je. Međutim, ćelije su tokom evolucije razvile različite odbranbene

mehanizme od toksičnih supstanci. Jedan od njih se zasniva na P-glikoproteinu lociranom na ćelijskoj membrani koji aktivnim transportom izbacuje DOX van ćelije (Goren i sar., 2000). Drugi mehanizmi podrazumevaju smanjen unos toksikanata preko transportera, aktivaciju enzima koji metabolišu lekove kao što su citohrom P450 i glutation S-transferaza, aktivaciju sistema reparacije DNK i izbegavanje apoptoze (Moitra, 2015). Tokom terapije, mogu se pojaviti tumorske ćelije koje su rezistentne na DOX. Rezistencija je proizvod klonalne selekcije onih ćelija koje prekomerno ekspimiraju P-glikoproteine povećavajući na taj način efluks leka, ili koje smanjeno ekspimiraju transportere za unos leka, aktiviraju reparaciju DNK i izbegavaju programiranu ćelijsku smrt (Pan i sar., 2016). Skorija istraživanja nanoformulacija koje obuhvataju istovremenu dostavu različitih hemioterapeutika sa sinergističkim delovanjem kao što su DOX u kombinaciji sa kurkuminom (Barui i sar., 2014), antitumorskim lekovima (Zhao i sar., 2015), kininom (Shen i Qiu, 2016) ili siRNK (Misra i sar., 2014), omogućavaju da se prevaziđe rezistencija ćelija na lek. Supresija iRNK koja kodira P-glikoprotein, kao i samog proteina, vodi povećanoj intraćelijskoj akumulaciji DOX-a pri čemu se pojačava njegova citotoksična aktivnost.

Nanotube (Ruibin i sar., 2010) i fulerenolski konjugati (Chaudhuri i sar., 2009a; Tang i sar., 2018) su se pokazali kao pogodni nanonosači DOX-a usled mogućnosti velikog broja hemijskih derivatizacija osnovne strukture čime se postižu prethodno navedene dizajnerske specifikacije.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu sve prethodno izneto, istraživanje u ovoj doktorskoj disertaciji je fokusirano na sintezu novih nanokompozita baziranih na fulerenolskim nanočesticama, koje bi u jednom slučaju poslužile kao nosač za DOX, a u drugom slučaju kao nosač za jone gvožđa (Fe^{2+}), kao i na testiranje bioloških efekata ovih nanokompozita u modelu toksičnosti indukovane DOX-om.

Shodno tome, postavljeni su sledeći specifični ciljevi:

- I. Sinteza stabilnih nanokompozita: FNP/DOX i FNP/ Fe^{2+}
- II. Fizičko-hemijska karakterizacija dva nanokompozita
- III. Ispitivanje unosa DOX-a, FNP-a i nanokompozita FNP/DOX u ćelije kao i efekat na ćelijski ciklus kod dve humane maligne ćelijske linije dojki
- IV. Ispitivanje citotoksičnosti samostalne primene DOX-a, FNP-a kao i nanokompozita FNP/DOX na imortalizovanoj ćelijskoj liniji kardiomiocita miševa
- V. Ispitivanje *in vivo* uloge dva nanokompozita, FNP/DOX i FNP/ Fe^{2+} , na kardiotoksičnost i hepatotoksičnost izazvanu DOX-om na pacovima soja Wistar.

Pri dizajniranju ovog istraživanja postavljene su sledeće radne hipoteze:

- Budući da FNP poseduje veliku površinu i negativno naelektrisanje, očekuje se da će za sebe vezivati kako na spoljašnjoj površini, tako i unutar same nanočestice, pozitivno naelektrisan DOX u obliku hidrohlorida, kao i da će za sebe vezivati pozitivne jone gvožđa i na taj način poslužiti kao njihov nosač u nanokompozitima FNP/DOX i FNP/ Fe^{2+} , čime će se efikasnije u ćelije unositi DOX i gvožđe.
- S obzirom da FNP poseduje antioksidativna svojstva, kao i da su zdrave ćelije otpornije na oksidativni stres izazvan DOX-om u odnosu na maligne, očekuje se

da kardiotoksičnost i hepatotoksičnost, nakon primene nanokompozita FNP/DOX i FNP/Fe²⁺, budu niže u odnosu na konvencionalni DOX.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Sinteza nanokompozita FNP/DOX

Fulerenolske nanočestice su formirane u dvostepenoj sintezi polazeći od fulerena C₆₀ (čistoće 99,8%, MER) koji je bromovan u prisustvu katalizatora FeBr₃ u cilju dobijanja simetričnog polibromnog derivata C₆₀Br₂₄ (Djordjević i sar., 1998). U narednom koraku, atomi broma iz C₆₀Br₂₄ su supstituisani hidriksilnim grupama u alkalnoj sredini (Mirkov i sar., 2004). Kao finalni proizvod dobijen je polihidroksilovani polianjonski fulerenski derivat (FNP) u amorfnoj formi koji je rastvoren u vodi do koncentracije 0.111 mM (pH= 6) i soniciran 20 minuta na 22 °C. Nakon sonikacije u 4 ml rastvora FNP je dodato 0,8 ml vodenog rastvora DOX (ADRIBLASTINA[®]RD, Pfizer: DOX-hidrochlorid 10 mg, laktoza 50 mg, metil p-hidroksibenzoat 1mg) koncentracije 1,84 mM. U cilju formiranja nanokompozita FNP/DOX, smeša je inkubirana u mraku narednih 48 h na 22 °C. Za pripremanje svih rastvora korišćena je dejonizovana voda provodljivosti 17,8 MΩ/cm.

3.2 Sinteza nanokompozita FNP/Fe²⁺

FNP, koji je pripremljen prema protokolu iz prethodnog poglavlja, upotrebljen je za sintezu nanokompozita FNP/Fe²⁺. U 50 μl 1,77mM rastvora FNP dodato je 200 μl dejonizovane vode (pH=6) i sonicirano 5 minuta na 22°C. Potom je, u novonastali vodeni rastvor FNP-a, dodato 15 μl 10 μM Fe²⁺. S obzirom da je fulerenol fotosenzitivan, smeša FNP i Fe²⁺ je ostavljena da stoji u mraku 48 h na 22 °C. Finalna koncentracija FNP-a rastvoru je bila 334 μM, dok je finalna koncentracija Fe²⁺ bila 0,566 μM.

3.3 Metode za fizičko-hemijsku i nanokarakterizaciju nanokompozita FNP/DOX i FNP/Fe²⁺

Nanokarakterizacija čestica obuhvata različite fizičko-hemijske metode koje daju sliku o kvalitetu sintetisanog materijala. Tom prilikom se stiče uvid u veličinu i

naelektrisanje nanočestica, njihovu stabilnost, morfologiju i raspodelu pri različitim uslovima u rastvorima.

3.3.1 Merenje veličine i naelektrisanja nanočestica

Metoda dinamičkog rasejanja svetlosti (DLS, eng. *dynamic light scattering*) omogućava određivanje raspodele veličina nanočestica u rastvorima, pri niskim koncentracijama i malim zapreminama uzorka. Primenom ove tehnike se ispituju stabilnost, procesi agregacije, kao i formiranja kompleksa biomolekula.

Hidrodinamički srednji prečnik FNP, nanokompozita FNP/DOX i nanokompozita FNP/Fe²⁺ je meren u demineralizovanoj vodi kao i u fiziološkom rastvoru metodom DLS (Nano-ZetaSizer, Malvern, UK) u zeta kivetama DTS 1600. Sva DLS merenja su izvršena na talasnoj dužini od 633 nm pri temperaturi od 22°C sa uglom detekcije od 173°. Na istom uređaju i pod istim uslovima je meren i ζ-potencijal (naelektrisanje) nanočestica. Sva merenja su ponovljena tri puta na tri uzorka.

3.3.2 Mikroskopija atomskim silama (AFM, eng. *Atomic Force Microscopy*)

Merenje AFM-om omogućava dobijanje topografije površine uzorka. Vrh konzole ima radijus manji od 10 nm i „lupka” po ispitivanoj površini uzorka pri čemu se na grafiku iscrtava morfologija uzorka. Kao površina na kojoj se uzorak nalazi koristi se visoko orjentisani pirolitički grafit (HOPG, eng. *highly oriented pyrolytic graphite*) uz kontoler sa više modusa (eng. *multimode quadrex SPM with a nanoscope IIIa controller*, Veeco Instruments, Inc.).

Površinska topografija FNP i nanokompozita FNP/DOX u vodenom rastvoru je analizirana korišćenjem AFM. Morfologija nanočestica kao i fazne slike su dobijene istovremeno uz pomoć standardnog „lupkajućeg” AFM moda korišćenjem komercijalne SNC (eng. *solid nitride cone*) AFM probe (NanoScience-Team Nanotec GmbH), sa prečnikom vrha manjim od 10 nm. Sva merenja su vršena na sobnoj temperaturi i ponovljena tri puta na tri uzorka.

3.3.3 Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)

TEM mikroskop stvara sliku pomoću visoko voltažnog snopa elektrona. Taj snop se emituje sa katode, ubrzava ga anoda dok se njegovo fokusiranje postiže elektrostatičkim poljem. Snop elektrona prolazi kroz preparat. Kako je talasna dužina elektrona znatno manja od talasne dužine fotona vidljive svetlosti, moć razlučivanja kod TEM je daleko veća nego kod svetlosnog mikroskopa što nanočestice čini „vidljivijim”.

Vodeni rastvori FNP i nanokompozita FNP/DOX su naneti na bakarnu mrežicu od 3.05 mm meša, osušeni na sobnoj temperaturi i mereni korišćenjem TEM (TEM-JEOL JEM 1400 sa ubrzavajućom voltažom od 120 kV i horizontalnim poljem od 261.2 nm). Sva merenja su ponovljena tri puta na tri uzorka.

3.3.4 Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM) kuplovana sa spektroskopijom zasnovanoj na disperzivnim X zracima (EDS, eng. *Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy*)

Veličina, oblik i disperznost FNP-a i nanokompozita FNP/Fe²⁺ su merene korišćenjem TEM-a (Talos F200X FEI, USA, operated at 200 kV). EDS sistem dodat TEM-u koji operiše u STEM modu je upotrebljen za hemijsku analizu uzoraka. Uzorci za TEM su pripremljeni po standardnoj proceduri prema kojoj su nanočestice prvo dispergovane u etanolu, a potom je kapljica rastvora smeštena na bakarnu mrežicu obloženu ugljenikom i ostavljena da se osuši na vazduhu. Sva merenja su ponovljena tri puta na tri uzorka.

3.4 Metode za ispitivanje biološke aktivnosti nanokompozita FNP/DOX *in vitro*

Metodologija uključena u ovaj segment eksperimentalnog rada je omogućila ispitivanje citotoksičnog potencijala nanokompozita FNP/DOX na dve maligne (MCF-7 i MDA-MB-231) i jednoj zdravoj ćelijskoj liniji (HL-1) kao i da ukaže na mogući mehanizam delovanja nanokompozita.

3.4.1 Gajenje malignih ćelijskih linija

MCF-7 (ATCC, HTB22) (ćelije luminalnog epitela tumora dojke pozitivne na estrogene receptore) i MDA-MB-231 (ATCC, HTB-26) (ćelije luminalnog epitela tumora dojke negativne na estrogene receptore) ćelije su gajene u DMEM medijumu (eng. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) (PAA) sa 4,5% glukoze, koji je suplementiran sa 10% goveđeg seruma (FCS, eng. *fetal calf serum*) (PAA) i antibioticima: 100 IU/cm³ penicilina i 100 µg/cm³ streptomicina (ICN Galenika). Pasažiranje ćelija je vršeno po dostizanju konfluentnosti od 90%. S obzirom da ćelije adheriraju za podlogu, u cilju njihovog odlepljivanja i dobijanja suspenzije ćelija za dalju analizu, korišćen je 0,25% tripsin u 0,02% rastvoru EDTA (Sigma-Aldrich). Obe ćelijske linije su zasejavane u flaskove (Costar, 25 cm²) i gajene u inkubatoru na 37 °C sa 100% vlage i 5% CO₂.

3.4.2 Tretman malignih ćelija

MCF-7 i MDA-MB-231 ćelije su zasejavane u gustini od 4x10⁴/cm². Ćelije su tretirane sledećim supstancama: DOX, FNP i FNP/DOX u trajanju od 2, 4, 24 i 48 h. Koncentracije DOX i FNP/DOX (računato na DOX) su bile 0,1 µM i 0,01 µM, dok je sam FNP aplikovan u koncentracijama od 0,111 mM i 0,0111 mM. Nakon tretmana ćelije su tripsinizovane, oprane dva puta hladnim rastvorom PBS i resuspendovane u PBS do koncentracije 1x10⁶ ćelija/ml. Ćelije su dalje korišćene u testovima unosa nanočestica u ćelije i u analizi ćelijskog ciklusa.

3.4.3 Gajenje HL-1 ćelija

HL-1 je kontinuirana mišja ćelijska linija kardiomiocita koji se kontrahuju i zadržavaju fenotipske karakteristike adultnih kardiomiocita (Claycomb 1998). Ćelije su gajene u Petri šoljama za primarnu kulturu prečnika 60 mm, u specijalnom medijumu (Claycomb Medium, Sigma-Aldrich) koji je suplementiran sa 10% goveđeg seruma (FCS, PAA), norepinefrinom finalne koncentracije 0,1 mM, L-askorbinskom kiselinom finalne koncentracije 0,3 mM i antibioticima 100 IU/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina (Gibco, Life Technologies). Pasažiranje ćelija je vršeno po dostizanju konfluentnosti od 90%. S obzirom da ćelije adheriraju za podlogu, u cilju dobijanja

suspenzije ćelija za dalju manipulaciju, tretirane su 0,25% tripsinom u 0,02% rastvoru EDTA (Sigma-Aldrich). Ćelije su gajene u inkubatoru na 37°C sa 100% vlage i 5% CO₂.

3.4.4 Tretman HL-1 ćelija i testiranje njihove vijabilnosti

HL-1 ćelije su sadene u ploče sa 96 bunarića (BD Falcon Transparent), u gustini od 2×10^4 ćelija po bunariću u četvoroplikatu i ostavljene 24 h da adheriraju za podlogu. Sutradan, ćelije su tretirane DOX i FNP/DOX u koncentracijama: 0, 0,5, 1, 1,875, 2,5, 3,75, 5, 7,5 i 10 μM i FNP u koncentraciji od 0,111 mM u trajanju od 24 h. Vijabilnost HL-1 ćelija je utvrđena korišćenjem MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid, Sigma-Aldrich) supstrata prema protokolu Upadhyay i saradnika sa manjim modifikacijama (Upadhyay i sar., 2007). Po tretmanu ćelije su inkubirane sa rastvorom MTT (0,5 mg/ml u PBS) naredna 2 h na 37 °C. Reakcija je zaustavljena odlivanjem supernatanta i dodavanjem 100 μl dimetil sulfoksida koji rastvara kristale formazana nastale enzimatskom aktivnošću mitohondrija (mitohondrijalne reduktaze redukuju žutu tetrazolijumsku so u ljubičasti formazan). Absorbancija je merena na talasnoj dužini od 550 nm, na spektrofotometru Infinite® 200 PRO (Life Sciences, TECAN). Absorbancija je direktno srazmerna količini MTT boje redukovane u formazan i broju preživelih ćelija. Određivanje IC₅₀ vrednosti (inhibitorna koncentracija za 50% ćelija) je izvršeno putem slobodno dostupnog programa na internetu IC₅₀ toolkit (ic50.tk).

3.4.5 Analiza unosa DOX-a i FNP/DOX-a u ćelije protočnom citometrijom

MCF-7 i MDA-MB-231 ćelije su tretirane 0,1 μM DOX-om i 0,1 μM FNP/DOX-om (u nanokompozitu koncentracija je izražena preko koncentracije DOX-a). MCF-7 ćelije su dodatno izložene 0,01 μM DOX s obzirom da nije bilo moguće izmeriti signal na protočnom citometru kada su ćelije tretirane sa 0,1 μM FNP/DOX usled visoke citotoksičnosti posle 24h tretmana. Nakon tretmana od 2 h, 4 h, 24 h i 48 h ćelije su tripsinizovane, oprane dva puta u hladnom PBS-u i resuspendovane u 250 μl PBS-a pre merenja. Protočnim citometrom (BD FACSCalibur, Beckton Dickinson) je merena fluorescencija, rezultati su analizirani programom CellQuest software i prikazani u

obliku histograma. DOX je ekscitiran argonskim laserom na talasnoj dužini od 488 nm, dok je emisijski signal sniman između 565 nm i 630 nm. Region za detekciju fluorescencije u zelenom delu vidljivog spektra je postavljen arbitrarno (FCS 1,00 Lin, FL2 476,1.00 Log). Po uzorku je mereno 15000 ćelija, a rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost fluorescencije u arbitrarnim jedinicama (a.j.). Eksperimenti su ponovljeni tri puta.

3.4.6 Analiza ćelijskog ciklusa protočnom citometrijom

Kontrolne ćelije i ćelije tretirane FNP-om, DOX-om i FNP/DOX-om su oprane u hladnom PBS-u i zatim inkubirane 30 minuta u 70% etanolu na ledu. Potom su ćelije centrifugirane i inkubirane sa 500 µl RNaze A (100 jedinica/ml, Sigma-Aldrich) i 500 µl propidijum jodida (400 µg/ml, Sigma-Aldrich) 30 minuta na 37 °C. Ćelijski ciklus je analiziran na protočnom citometru (FACSCalibur E440, Becton Dickinson) programom CellQuest software. Eksperimenti su ponovljeni tri puta.

3.5 Životinje, eksperimentalni dizajn i izolovanje organa

Odrasli zdravi mužjaci pacova soja Wistar su gajeni u kontrolisanim uslovima (temperatura 22±1°C, relativna vlažnost vazduha 70±10% u dnevno noćnom režimu 12/12 h sa slobodno dostupnom hranom i vodom). Svi eksperimenti su odobreni od strane Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije, uprava za veterinu, broj: 323-07-03640/2015-05 i u saglasnosti sa odredbama Zakona o dobrobiti životinja (Službeni glasnik RS, broj 41/09).

Paralelno su urađena dva eksperimenta. Prvi eksperiment se odnosi na ispitivanje efekata nanokompozita FNP/DOX, gde su životinje nasumično podeljene u šest grupa sa po šest jedinki (Tabela 1). Sve životinje su tretirane jednokratno intraperitonealno (*i.p.*) i u zavisnosti od grupe su primile fiziološki rastvor (0,9% NaCl) ili vodeni rastvor FNP-a, DOX-a, FNP/DOX-a.

Tabela 1. **Tretman životinja**

Grupa Wistar pacova	Tretman
I grupa	Kontrolna grupa 0,9% NaCl
II grupa	FNP 0,125 mg/kg
III grupa	DOX 4 mg/kg
IV grupa	FNP/DOX 4 mg/kg*
V grupa	DOX 2 mg/kg
VI grupa	FNP/DOX 2 mg/kg*

* Koncentracija nanokompozita FNP/DOX je izražena prema koncentraciji DOX-a.

Drugi eksperiment se odnosi na ispitivanje efekata nanokopozita FNP/Fe²⁺, gde su životinje nasumično podeljene u pet grupa sa po šest životinja (Tabela 2.). Sve životinje su tretirane jednokratno intraperitonealno (*i.p.*) i u zavisnosti od grupe su primile vodeni rastvor FNP, DOX, FNP/Fe²⁺, FNP/Fe²⁺ 1h pre DOX-a ili fiziološki rastvor (0,9% NaCl). S obzirom da su eksperimenti rađeni paralelno, da se ne bi žrtvovalo više pacova nego što je neophodno za statističku obradu podataka, u drugom eksperimentu, tokom analize rezultata, su upotrebljene iste životinje iz prve tri grupe prvog eksperimenta: Kontrolna grupa 0,9% NaCl, FNP 0,125 mg/kg grupa i DOX 4 mg/kg grupa.

Tabela 2. Tretman životinja

Grupa Wistar pacova	Tretman
I grupa	Kontrolna grupa 0,9% NaCl
II grupa	FNP 0,125 mg/kg
III grupa	DOX 4 mg/kg
IV grupa	FNP/Fe ²⁺ 0,06 mg/kg*
V grupa	FNP/Fe ²⁺ 0,06 mg/kg + DOX 4 mg/kg *

* Koncentracija nanokompozita FNP/Fe²⁺ je izražena prema koncentraciji FNP-a.

Nakon akutnog tretmana u trajanju od 24 h, životinje su žrtvovane uretanskom anestezijom (Arola i sar., 2000). Srca i jetre su odmah odstranjeni i delovi tkiva srca veličine oko 5 mm³ su uzorkovani iz leve komore, dok su delovi jetre uzorkovani iz velikog lobusa jetre, i stavljeni u rasvor RNAlater na -20°C radi kasnije izolacije RNK. Istovremeno, za ultrastrukturnu analizu putem TEM-a, tkivo srca je uzorkovano sa apeksa srca i tkivo jetre je uzorkovano iz velikog lobusa jetre, i fiksirano imerzijom u neutralno puferisan 3% glutaraldehid (0,1 M kokodilatni ili fosfatni pufer, pH=7,4) preko noći na 4 °C.

3.6 Priprema uzoraka tkiva za TEM

Nakon fiksacije, uzorci su oprani u puferu za fiksaciju i postfiksirani 1% rastvorom osmijum tetraoksida u 0,1 M kokodilatnom puferu i zatim inkubirani 1 h na 4°C. Nakon dehidratacije tkiva u seriji alkohola rastuće koncentracije, uzorci su ukalupljeni u eponskoj smoli sastava: 4,8 ml epona (eng. *epoxy embedding medium*) (Fluka Chemika 45345, Steinheim, Switzerland), 1,7 ml DDSA (eng. *dodecanyl succinic anhidride*, C₁₆H₂₆O₃) (Agar Scientific Ltd R1053, Stansted, Essex, England), 3,5 ml MNA (Epon Hardener MNA) (Fluka Chemika 45347, Steinheim, Switzerland) i 0,2 ml BDMA (eng. *N-benzildimethylamine*, C₆H₅CH₂N(CH₃)₂) (Agar Scientific Ltd R1062b, Stansted, Essex, England). Ukalupljena tkiva su sečena na ultramikrotomu (LKB Ultratom 8800) na ultratanke preseke debljine 70 nm. Ultratanki preseki su kontrastirani rastvorima soli teških metala, uranil acetatom i olovo-citratom (Alkaloid-

Skopje, FYRM) i analizirani elektronskim mikroskopom (FEI Morgagni 268D transmission electron microscope, Eindhoven, the Netherlands ili Philips CM12/FEI, the Netherlands) opremljenim digitalnom kamerom MegaViewIII Soft Imaging System (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany).

3.7 Ekstrakcija RNK i reverzna transkripcija

Ukupna ćelijska RNK je izolovana kitom GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) prema instrukciji proizvođača. Tkivu srca i jetre kome je odstranjen RNA_{later}, homogenizovano je ručnim homogenizerom i lizirano uz pomoć 250 µl rastvora za liziranje u kome je dodat 2-merkaptoetanol (10 µl 2-merkaptoetanol na 1 ml rastvora za liziranje). Lizat, u kome se nalazi RNK oslobođena iz tkiva, je prenet u filtracionu kolonu i centrifugiran 2 min na 16 000 g. Filtratu je dodato 250 µl 70% etanola nakon čega je prenet na vezujuću kolonu i centrifugiran 15 s na 16 000 g. Da bi se uklonili potencijalni kontaminati, RNK vezana za kolonu je isprana prvi put sa 500 µl rastvora 1 za ispiranje i centrifugirana 15 s na 16 000 g a potom sa 500 µl rastvora 2 za ispiranje i centrifugirana 15 s na 16 000 g. Da bi se uklonio višak etanola postupak ispiranja sa 500 µl rastvora 2 za ispiranje je ponovljen i kolona centrifugirana 2 min na 16 000 g. Elucija RNK sa kolone je izvršena uz pomoć 50 µl elucionog rastvora i centrifugiranja od 1 min na 16 000 g. Prečišćena RNK je stavljena na led do početka merenja koncentracije. Koncentracija RNK je određivana merenjem A_{260} na spektrofotometru (BioSpec-nano spectrophotometer, Shimadzu Corporation). Nakon izolacije RNK iz različitih uzoraka, cDNK je sintetisana u reakciji reverzne transkripcije (RT) korišćenjem jednakih količina RNK (1 µg) kao matrice i pomoću kita RETROscript Reverse Transcription Kit (Ambion, Life Technologies) prema instrukciji proizvođača. Totalna RNK u količini od 1 µg je pomešana sa 2 µl nasumičnih dekamera pri čemu je reakciona smeša dopunjena vodom do 12 µl. Reakciona smeša je kratko oborena i inkubirana u vodenom kupatilu na 72 °C 3 min. Nakon inkubacije u reakcionu smešu su dodati: 2 µl 10X koncentrovanog pufera za RT, 4 µl smeše deoksinukleotidtrifosfa, 0,5 µl inhibitora rnaze, 0,5 µl reverzne transkriptaze i 1 µl vode. Finalni volumen RT reakcije je iznosio 20 µl. Reakcija se odigravala inicijalno na 42 °C 2 h, a zatim 10 min na 92 °C. Sintetisana cDNK je dalje korišćena za qRT-PCR (eng. *Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction*) analizu.

3.8 qRT-PCR analiza

qRT-PCR je korišćen za kvantifikovanje ekspresije gena za katalazu, Mn-SOD (eng. *Mn-superoxide dismutase*), Bax (eng. *BCL2-associated X protein*) i Bcl-2 (eng. *B-cell CLL/lymphoma 2*). qRT-PCR reakcione smeše zapremine 20 µl su sadržavale komercijalnu smešu reagenasa (SYBR Select Master Mix, Applied Biosystems), 5' i 3' prajmere (Invitrogen) i cDNK matricu. Finalna koncentracija prajmera je bila 300 nM. Sekvence prajmera su date u Tabeli 3. *GAPDH* (eng. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, „čuvar” genoma) je služio kao endogena kontrola. Za qRT-PCR su korišćene ploče sa 96 bunarića (MicroAmp optical 96-well research Plate, Applied Biosystems) i 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Temperaturni i vremenski profil reakcije za qRT-PCR je bio: inicijalni korak na 50 °C, 2 min, drugi korak na 95°C, 10 min, treći korak od 40 ciklusa od 15 s na 95°C, i 1 min na 60 °C. Rezultati qRT-PCR su obrađeni komparativnom C_T metodom (Livak i Schmittgen 2001)

Tabela 3. Lista prajmera za umnožavanje regiona cDNK ispitivanih gena metodom qRT-PCR-a. F, forward, 5' prajmer R, reverse, 3' prajmer

Gen, Pristupni broj*	Sekvence prajmera	Izvor
GAPDH NM_017008.4	F: 5'-TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG- 3' R: 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'	Primer Express v3.0 Software
CAT NM_012520.2	F: 5'-ACAACCTCCAGAAAGCCTAAGAATG-3' R: 5'-GCTTTTCCCTTGGCAGCTATG-3'	(Chen i sar., 2006)
Mn-SOD NM_017051.2	F: 5'-ATTAACGCGCAGATCATGCAG-3' R: 5'-TTTCAGATAGTCAGGTCTGACGTT-3'	(Sugino i sar., 1998)
BAX NM_017059.2	F: 5'-ACACCTGAGCTGACCTTG-3' R: 5'-AGCCCATGATGGTTCTGATC-3'	(Parveen i sar., 2014)
Bcl-2 NM_016993.1	F: 5'-GGGATGCCTTTGTGGAACCTATATG-3' R: 5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAGA-3'	Primer Express v3.0 Software

*NCBI (eng. *the national center for biotechnology information*) baza podataka, GAPDH (eng. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), CAT (engl. *catalase*), Mn-SOD (eng. *Mn-superoxide dismutase*), Bax (eng. *Bcl-2-associated X protein*), Bcl-2 (eng. *B-cell CLL/Lymphoma 2*).

3.9 Statistička obrada podataka

Nakon analize unosa DOX i FNP/DOX u ćelije, analize ćelijskog ciklusa, MTT testa i analize genske ekspresije, urađena je statistička obrada podataka programom Microsoft Excel. Kod MTT testa rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD). Kod analize unosa DOX i FNP/DOX u ćelije rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost fluorescencije u arbitrarnim jedinicama. Kod analize ćelijskog ciklusa rezultati su prikazani kao procenat ukupnog broja ćelija u određenoj fazi ćelijskog ciklusa. Kod analiza genske ekspresije rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška (SEM). Student-ov *t*-test je korišćen za poređenje podataka. Razlike su smatrane statistički značajnim kada je $p < 0.05$.

4. REZULTATI

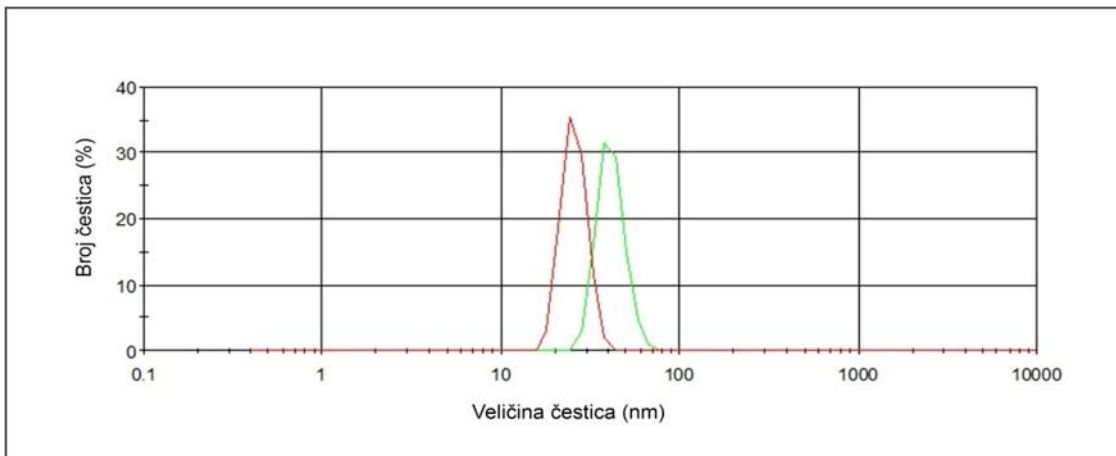
Rezultati istraživanja u okviru ove doktorske teze su prikazani u dve celine: 1) prva obuhvata fizičko-hemijsku karakterizaciju i biološke efekte nanokompozita FNP/DOX, 2) dok druga celina daje pregled fizičko-hemijske karakterizacije nanokompozita FNP/Fe²⁺ i njegovog biološkog uticaja u predtretmanu sa DOX-om.

4.1 FNP/DOX nanokompozit

Segment vezan za istraživanja na nanokompozitu FNP/DOX obuhvata tri podceline: 1) nanokarakterizaciju nanočestica, 2) analizu unosa u ćelije i uticaja na ćelijski ciklus nanokompozita FNP/DOX i analizu njegovog citotoksičnog potencijala, 3) analizu kardiotoksičnosti i hepatotoksičnosti nanokompozita FNP/DOX kod pacova praćenjem ekspresije odabranih gena uključenih u apoptozu i oksidativni stres, kao i ultrastrukturnih promena na srcu i jetri.

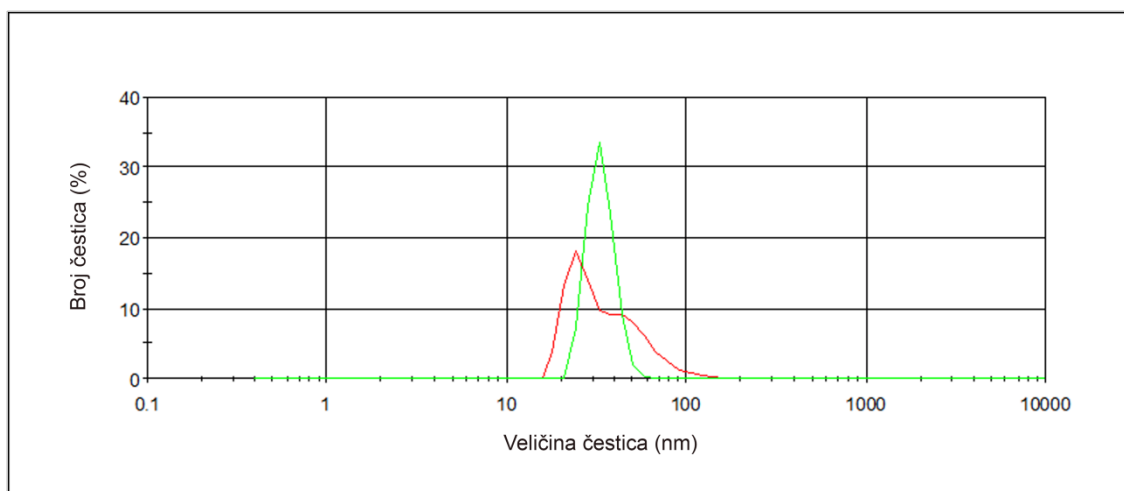
4.1.1 Nanokarakterizacija FNP-a i nanokompozita FNP/DOX

Na Slici 8 je prikazana distribucija veličine FNP nanočestica po broju u vodenom rastvoru. Prečnik nanočestica varira u opsegu od 17 - 42 nm pri čemu najveći broj nanočestica (35%) ima dijametar od 24 nm. Na istom dijagramu je prikazana distribucija veličine nanokompozita FNP/DOX u opsegu od 25 - 67 nm, pri čemu su nanočestice od 38 nm najprisutnije (31%). Podaci su dobijeni metodom baziranoj na dinamičkom rasejanju svetlosti.



Slika 8. Distribucija veličine čestica FNP (crvena linija) i nanokompozit FNP/DOX (zeleno linija) po broju u vodenom ratvoru pri pH=6,48, nakon 48 h inkubacije u mraku na 22 °C (Jović i sar., 2016)

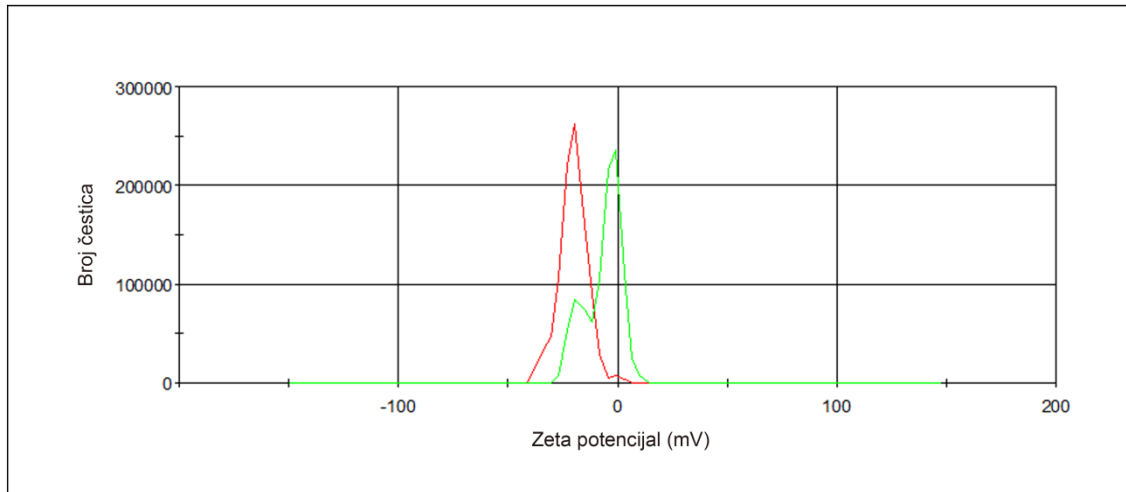
Fiziološki rastvor nije značajnije uticao na distribuciju veličine nanočestica FNP/DOX (Slika 9). Distribucija veličine čestica FNP je bila u opsegu od 20 -58 nm, sa najdominantnijim česticama prečnika 32,6 nm (33%). Slično, veličina čestica FNP/DOX se kretala od 18,7 - 105 nm, sa najdominantnijim česticama prečnika 24,3 nm (18%) (Slika 9).



Slika 9. Distribucija veličine čestica FNP-a (zeleno linija) i nanokompozit-a FNP/DOX (crvena linija) po broju u fiziološkom ratvoru, nakon 48h inkubacije u mraku na 22 °C (Petrovic at al. 2018)

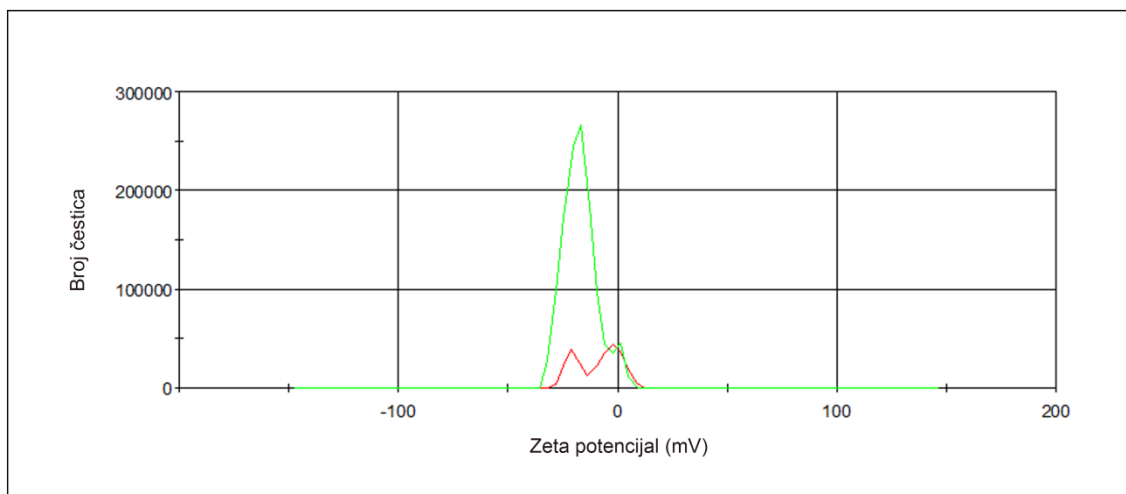
Merenja zeta potencijala su pokazala da FNP u vodenom rastvoru poseduje naelektrisanje od -20mV, dok vrednost za FNP/DOX iznosi -6mV (Slika 10) što

ukazuje na postojanje elektrostatičke interakciju između pozitivno naelektrisanih molekula DOX-a i polianjonskih molekula fulerenola.



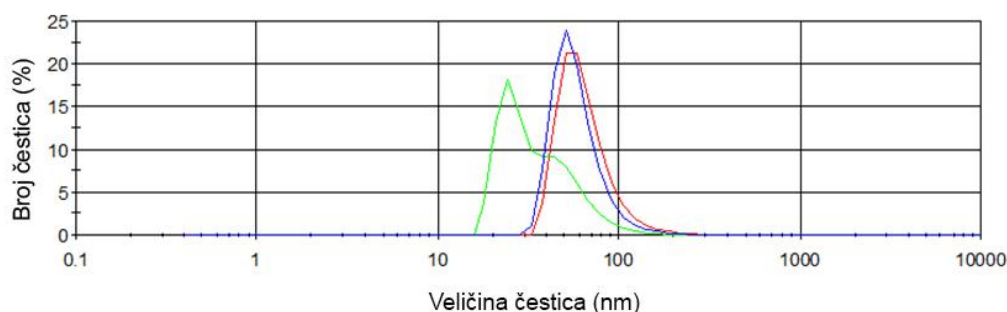
Slika 10. Zeta-potencijal FNP (crvena linija) i nanokompozit FNP/DOX (zelena linija) u vodenom rastvoru pri pH=6,48 nakon 48 h inkubacije u mraku na 22 °C (Jović i sar., 2016)

Fiziološki rastvor nije značajnije uticao ni na promenu ζ -potencijala FNP/DOX (Slika 11); srednje naelektrisanje FNP je -19 mV, dok srednje naelektrisanje FNP dekorisanog sa DOX iznosi -9 mV.



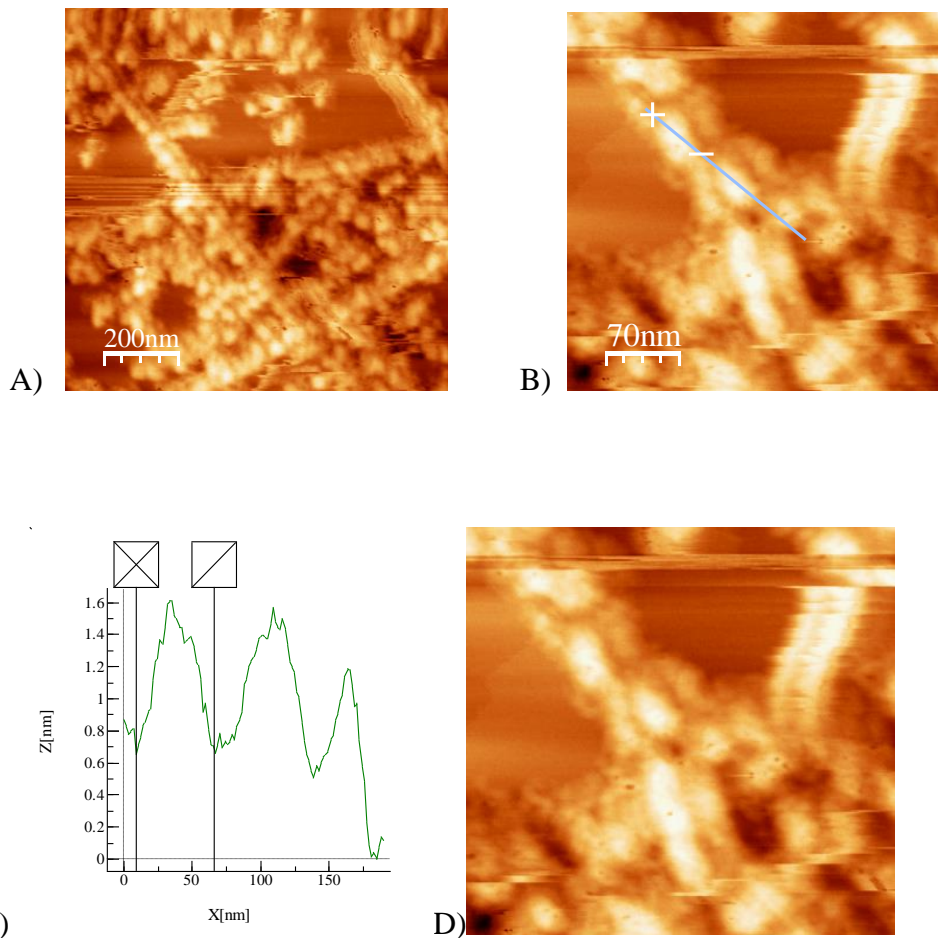
Slika 11. Zeta-potencijal FNP (zelena linija) i nanokompozit FNP/DOX (crvena linija) u fiziološkom rastvoru nakon 48 h inkubacije u mraku na 22 °C (Petrovic i sar., 2018)

Stabilnost čestica nanokompozita je praćena merenjem njihovog dijametra u dužem vremenskom periodu nakon sinteze. Nakon 48 h prećnik nanoćestica FNP/DOX je bio u opsegu od 18 -105 nm (18% ćestica ima prećnik od 24 nm, Slika 12, zelena linija). Nakon 72 h nanoćestice su bile u opsegu od 32 nm do 122 nm (gde najveći broj ćestica, 24% ima prećnik od 50 nm, Slika 12, plava linija) i nakon 96 h nanoćestice su bile u opsegu od 32 nm do 141 nm (gde najveći broj ćestica, 21% ima prećnik od 51 nm, Slika 12, crvena linija). Na osnovu dobijenih rezultata se moųe zakljućiti da tokom vremena distribucija velićine nanoćestica raste i potom ostaje stabilna u nanometarskom okviru.



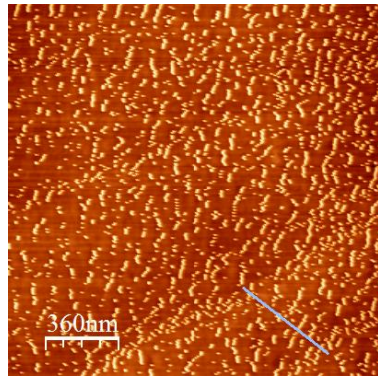
Slika 12. Distribucija velićine nanokompozita FNP/DOX po broju u fiziološkom rastvoru, nakon 48h (zelena linija), 72 h (plava linija) i 96 h (crvena linija) inkubacije u mraku na 22 °C (Seke i sar., 2016)

Uvid u površinsku topologiju nanonoćestica FNP i FNP/DOX je omogućen merenjima na AFM. Uzorci su snimljeni nakon inkubacije 48 h u mraku, na 22 °C. Na Slici 13 su predstavljeni rezultati AFM merenja FNP u vodenom rastvoru na pH = 7,0 koji ukazuju na nehomogenost uzorka (Slika 13A). Prisustvo nanoćestica je evidentno na terasama HOPG, pri ćemu je izabrana jedna reprezentativna ćestica za detaljniju analizu, prećnika 60 nm (Slika 13B), i visine 1,6 nm (Slika 13C). Veće ćestice u uzorku FNP se sastoje od 2-4 ćestice od po 30nm, dok prisustvo ćestica većih od 150 nm nije detektovano. Distribucija FNP na terasama HOPG-a ukazuje na njihovu polarnost, što je u skladu sa merenjima zeta-potencijala kao i sa rezultatima drugih studija (Vileno i sar., 2006). Na Slici 13D je predstavljena morfologija FNP trodimenzionalno (3D) na HOPG, gde se struktura veće ćestice jasno vidi. Nanoćestice na prvi pogled, usled metodologije merenja imaju izgled kupe. Međutim, kada se uporede njihova visina i širina koja je oko deset puta veća, zakljućuje se da su pljosnatog, diskoidalnog oblika.

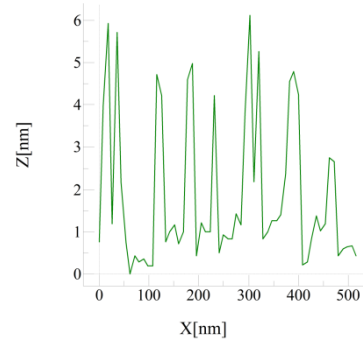


Slika 13. AFM snimci čestica FNP u vodenoj sredini nakon inkubacije 48 h u mraku na 22 °C; A) skala 1000 x 1000 nm²; B) skala 350 x 350nm²; B) odgovarajući poprečni presek duž plave linije; C) 3D slika

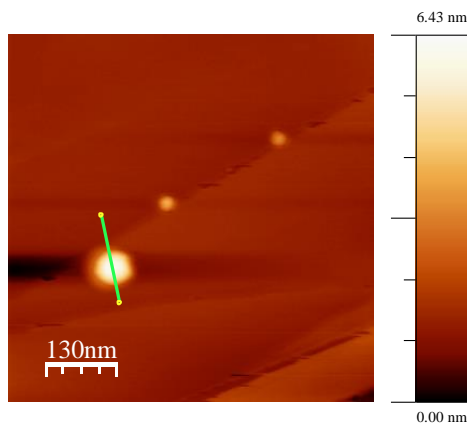
Na Slikama 14A i 14B uočava se prisustvo velikog broja homogeno raspoređenih nanočestica FNP/DOX čija je veličina u korelaciji sa DLS merenjima. Najprisutnije su čestice veličine između 20 i 35 nm, a uočljive su i veće čestice, veličine od 50 - 80 nm. Na Slici 14D je prikazan poprečni presek jedne veće čestice širine 85 nm i visine 5,1 nm. Pored nje, se na Slici 14E vide još dve manje nanočestice. Prisustvo nanočestica na terasama HOPG ukazuje na njihovu polarnost. S obzirom da je širina čestica 10-20 puta veća od njihove visine, izvodi se zaključak da dekoracija nanočestica DOX-om nije uticala na promenu njihove morfologije tj. ostale su pljosnate.



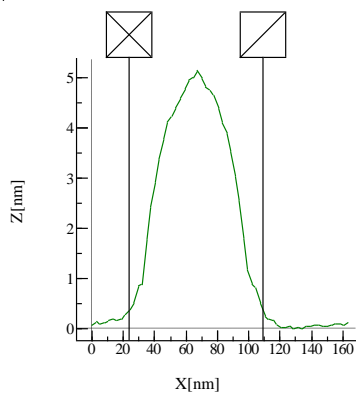
A)



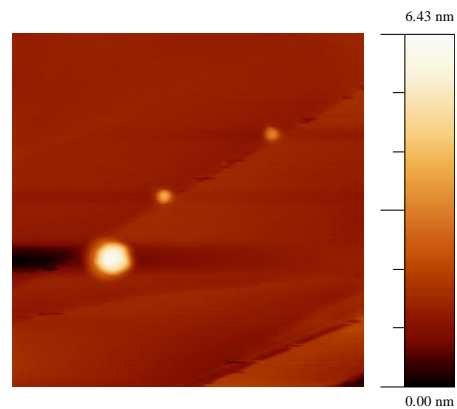
B)



C)



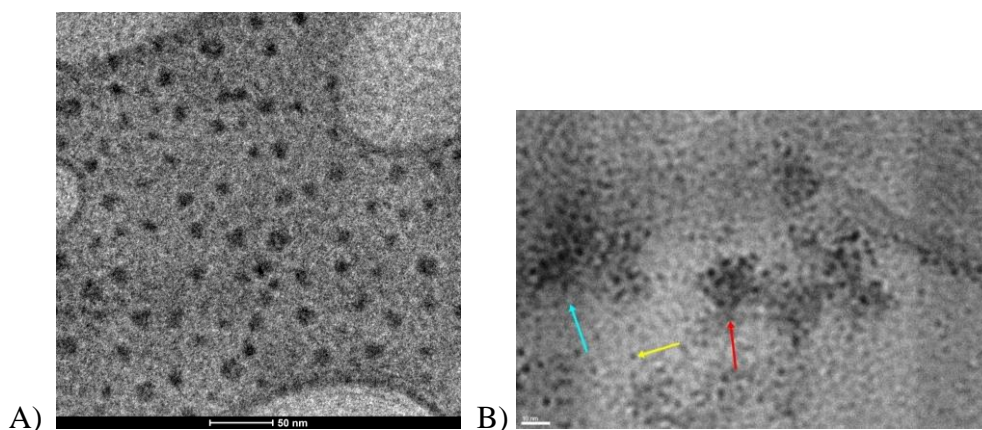
D)



E)

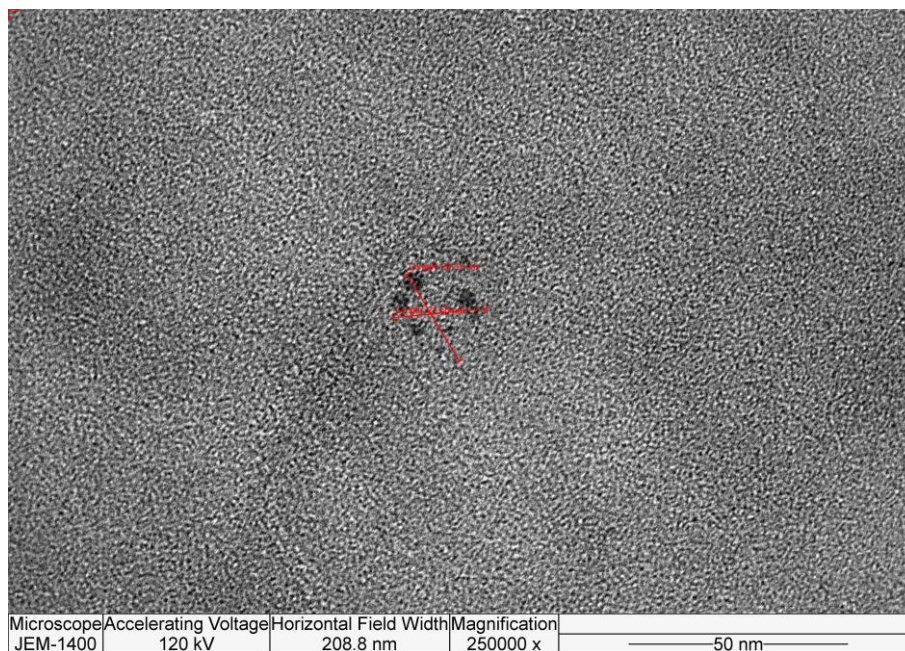
Slika 14. AFM snimci FNP/DOX u vodenoj sredini nakon inkubacije 48 h u mraku na 22 °C; A) skala 1800 x 1800nm² B) odgovarajući poprečni presek C) skala 670 x 670 nm² D) odgovarajući poprečni presek duž zelene linije na C E) 3D slika (Seke i sar., 2016)

Snimak TEM merenja FNP u vodenom rastvoru nakon sonikacije i inkubacije 48 h u mraku na 22 °C je prikazan na Slici 15. Kako TEM merenja daju detaljniji uvid u morfologiju čestica, primećuje se sferna struktura FNP različitog dijametra, što se uklapa u DLS i AFM merenja. Tako se na Slici 15 uočavaju čestice veličine od 2 nm sačinjene od 2-3 molekula fulerenola kao i veći agregati veličine između 20 i 60 nm.



Slika 15. A) TEM mikrografija FNP (fulerenolske nanočestice) B) FNP čestice veličine 2 nm (žuta strelica), 20 nm (crvena strelica) i 30-60 nm (plava strelica) (Jović i sar., 2016)

TEM merenja nanokompozita FNP/DOX u vodi nakon 48 h inkubacije u mraku na 22 °C su prikazana na Slici 16 gde se mogu uočiti nanočestice različitih veličina, od 2 nm do 5nm. Pretpostavka je da se manje čestice grupišu u veće aglomerate prečnika oko 20 nm koji su uočeni prilikom AFM i DLS merenja. Ove čestice takođe zadržavaju sferičnu strukturu bez obzira na prisustvo DOX.



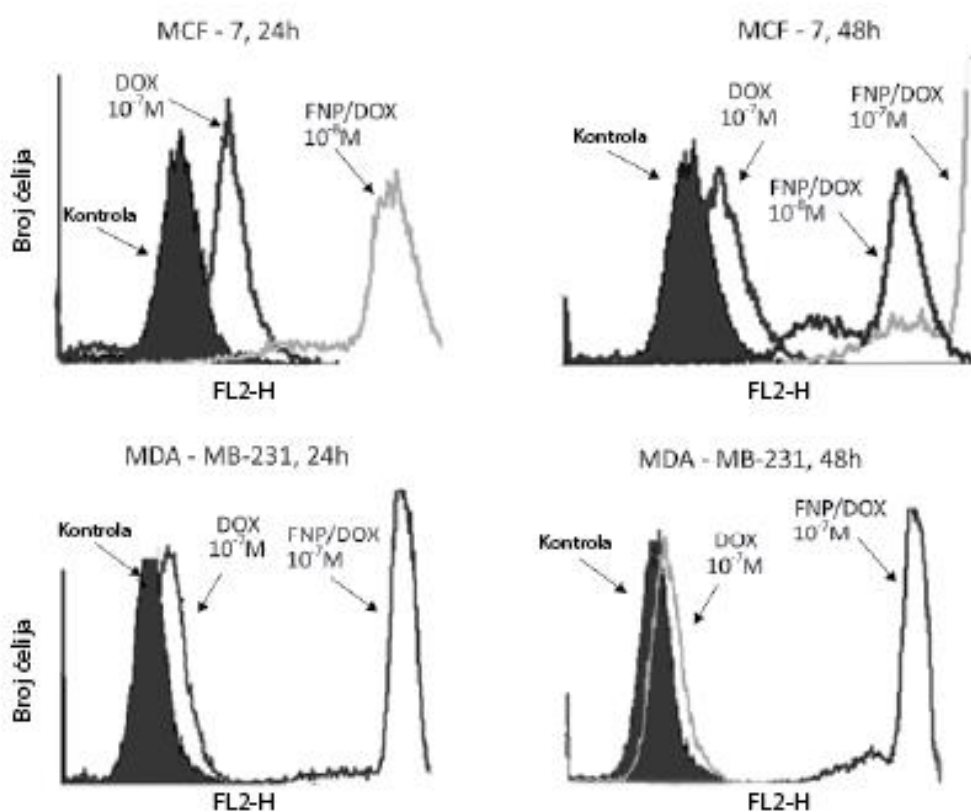
Slika 16. TEM mikrografija nanokompozita FNP/DOX (Petrovic i sar., 2018)

4.1.2 Nanokompozit FNP/DOX povećava unos DOX-a u MCF-7 i MDA-MB-231 ćelije

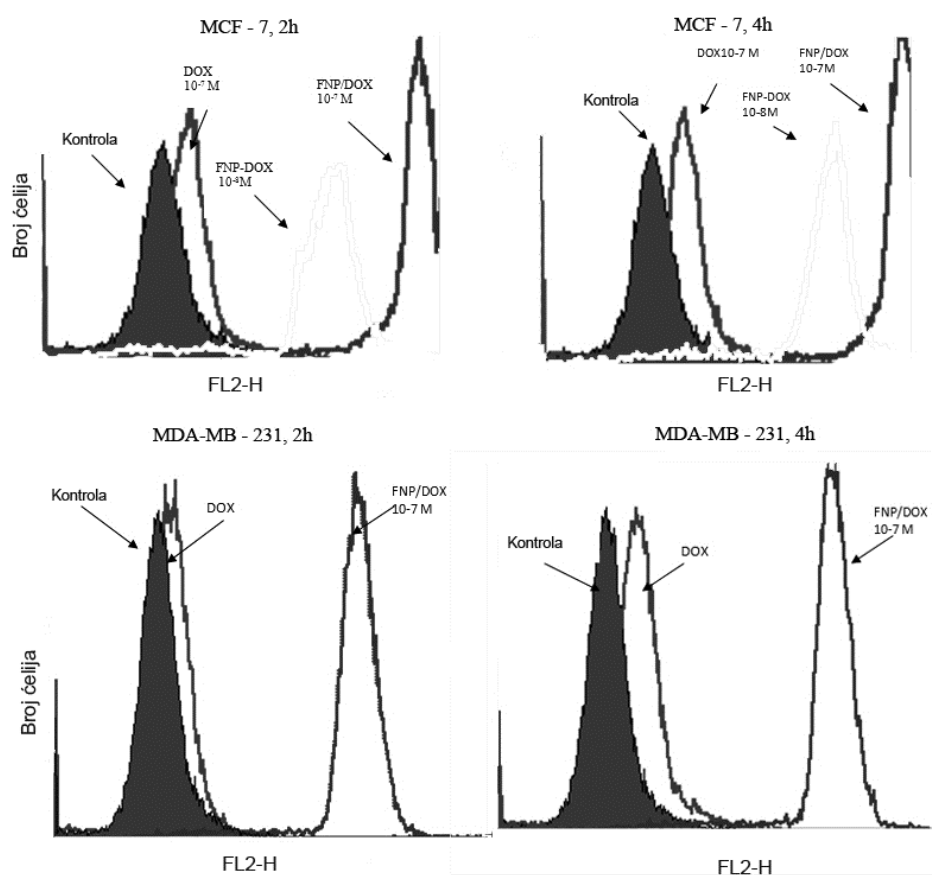
Da bi se istražio uticaj FNP na unos DOX-a, MCF-7 i MDA-MB-231 ćelije su tretirane sa dve koncentracije DOX i FNP/DOX ($0,1 \mu\text{M}$ i $0,01 \mu\text{M}$) u trajanju od 2 h, 4 h, 24 h i 48 h nakon čega je protočnom citometrijom meren intenzitet fluorescencije DOX-a. Netretirane ćelije su korišćene kao negativna kontrola.

Slike 17 i 18 prikazuju da je DOX uspešno internalizovan u ćelije u odnosu na kontrolne ćelije u svim vremenskim tačkama. Unos FNP/DOX-a u ćelije je bio nekoliko puta veći u obe ćelijske linije u poređenju sa slobodnim DOX-om, u svim vremenskim tačkama. Prema srednjem intenzitetu fluorescencije, unos oba jedinjenja je bio bolji kod MCF-7 ćelija u odnosu na MDA-MB-231 u svakoj vremenskoj tački, a posebno tokom tretmana u trajanju od 2 h i 4 h. Međutim, odnos unosa FNP/DOX u poređenju sa DOX je bio veći kod MDA-MB-231 ćelija u poređenju sa MCF-7 ćelijama (MCF-7 - 2.1 put, MDA-MB-231 - 3.1 put). Maksimalna fluorescencija DOX i FNP/DOX kod MCF-7 je uočena nakon 24 h, dok je kod MDA-MB-231 ćelija ona postignuta nakon 48 h. Visoka srednja vrednost fluorescencije DOX-a i FNP/DOX-a kod MCF-7 ćelija je u saglasnosti sa njihovom visokom osetljivošću kako na slobodan

DOX tako i na DOX koji se unosi putem nanokompozita. S obzirom da nije bilo moguće snimiti histogram za FNP/DOX nakon 24 h na definisanim parametrima regiona detekcije (FCS 1,00 Lin, FL2 476,1,00 Log), MCF-7 ćelije su tretirane 10 puta (jedan log) manjom koncentracijom FNP/DOX ($0,01 \mu\text{M}$). Međutim intenzitet fluorescencije u ćelijama je još uvek bio visok i dostizao je maksimum na 24 h (Slike 17 i 18). Intenzitet fluorescencije DOX-a i FNP/DOX-a je opao nakon 48 h kod oba tipa ćelija.



Slika 17. Unos DOX-a i FNP/DOX-a u MCF-7 i MDA-MB-231 nakon 24 h i 48 h. Intenzitet fluorescencije DOX-a je meren protočnom citometrijom. Rezultati predstavljaju preklopljene histograme jednog reprezentativnog eksperimenta (Jović i sar., 2016)



Slika 18. Unos DOX i FNP/DOX u MCF-7 i MDA-MB-231 nakon 2 h i 4 h. Intenzitet fluorescencije DOX-a je meren protočnom citometrijom. Rezultati predstavljaju preklopljene histograme jednog reprezentativnog eksperimenta (Jović i sar., 2016)

4.1.3 Nanokompozit FNP/DOX menja distribuciju MCF-7 i MDA-MB-231 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

Protočnom citometrijom su analizirane MCF-7 i MDA-MB-231 ćelije u različitim fazama ćelijskog ciklusa nakon 24 h i 48 h tretmana sa 0,1 μM DOX-om i 0,1 μM FNP/DOX-om. Efekti slobodnog DOX-a i nanokompozita FNP/DOX na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa su analizirani bojenjem DNK propidijum jodidom.

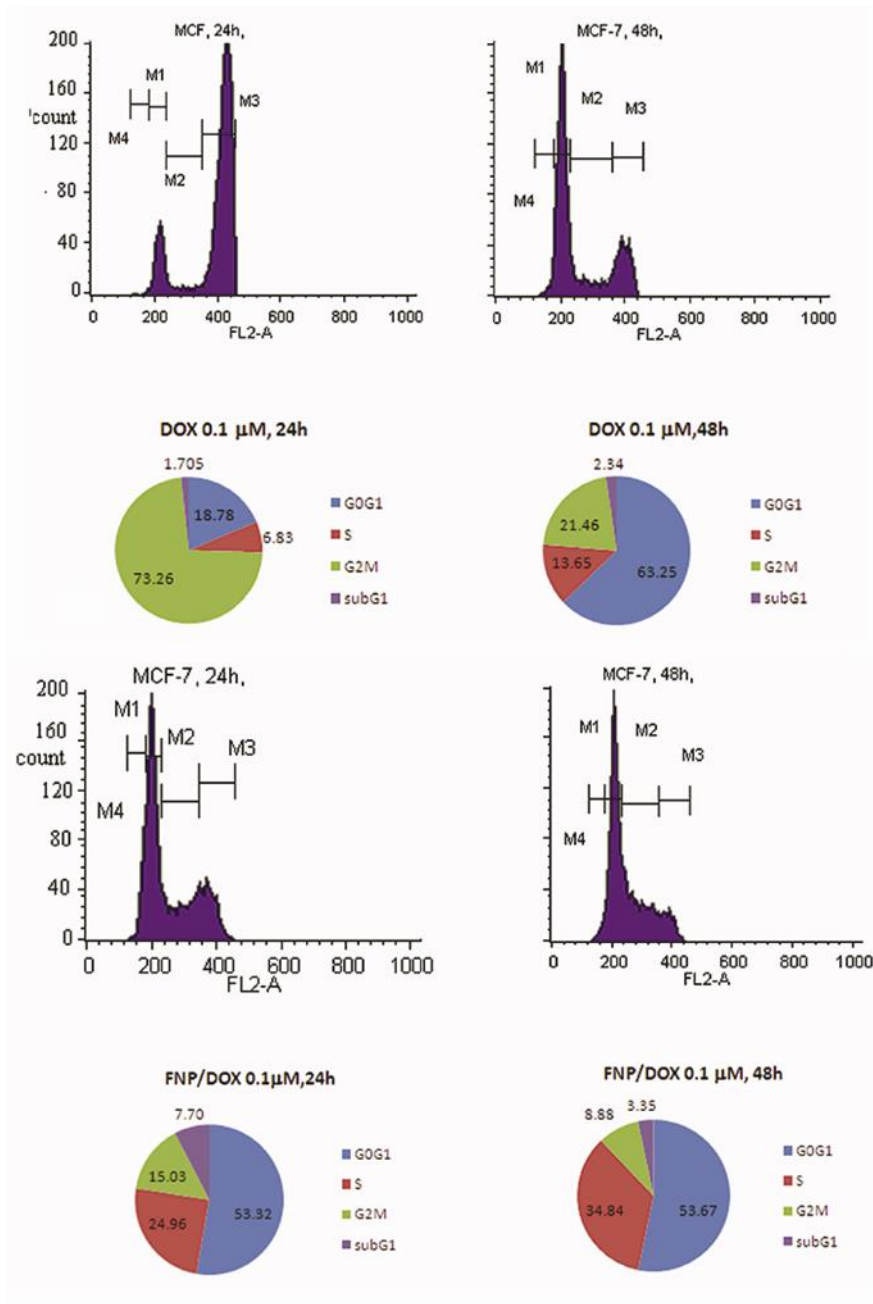
Rezultati distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa netretiranih MCF-7 ćelija su pokazali da se 65,19% ćelija nalazi u G0G1 fazi, 17,29% u S fazi, 15,39 u G2M fazi i 2,93% u subG1 fazi nakon 24 h. Nakon 48 h, 69,93% ćelija se nalazilo u G0G1 fazi 17,27 u S fazi, 11,69% u G2M i 1,97% u subG1 fazi (Tabela 4).

Tabela 4. Distribucija kontrolnih MCF-7 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa (%)

Kontrola				
Dužina tretmana (h)	Faze ćelijskog ciklusa			
	G0G1	S	G2M	subG1
24	65,19	17,29	15,39	2,93
48	69,93	17,27	11,69	1,97

Rezultati analize distribucije MCF-7 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana DOX-om u trajanju od 24 h su bili sledeći: 18,78% se nalazi u G0/G1, 6,83% u S fazi, 73,26% u G2/M i 1,705% u subG1 fazi ćeliskog ciklusa (Slika 19). Nakon 48 h tretmana DOX-om, 63,25% ćelija se nalazi u G0/G1 fazi, 13,65% se nalazi u S fazi, 21,46% u G2M i 2,34% u subG1 fazi (Slika 19).

Rezultati analize distribucije MCF-7 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana FNP/DOX-om u trajanju od 24 h su bili sledeći: 53,32% ćelija se nalazi u G0/G1, 24,96% u S fazi, 15,03% u G2M fazi i 7,7% u subG1 fazi ćelijskog ciklusa (Slika 19). Nakon 48 h tretmana FNP/DOX-om zapaža se da se 53,67% ćelija nalazi u G0G1 fazi, 34,84% u S fazi, 8,88% u G2M fazi i 3,35% u subG1 fazi ćelijskog ciklusa (Slika 19).



Slika 19. Distribucija MCF-7 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana DOX i FNP/DOX. MCF-7 su bile tretirane DOX-om i FNP/DOX-om u trajanju od 24 h i 48 h. Rezultati na histogramu su izraženi u %. M1, M2, M3 i M4 se odnose na G0/G1, S, G2/M i subG1, redom (Jović i sar., 2016)

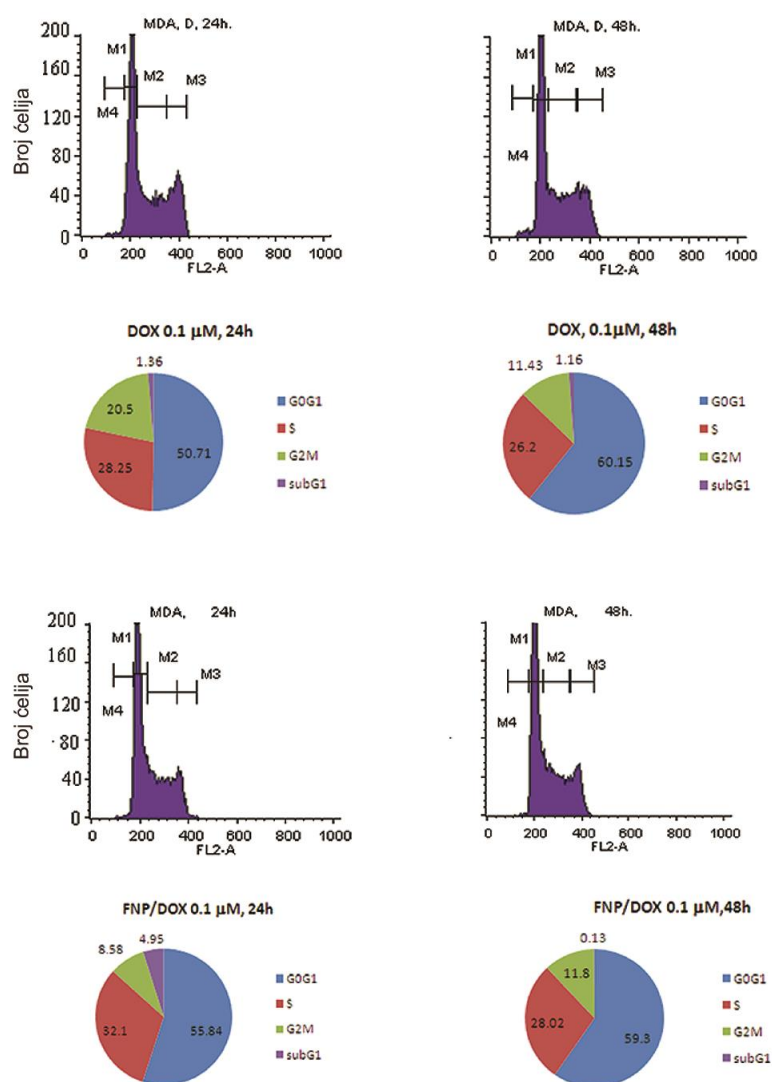
Distribucija netretiranih MDA-MB-231 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa je određena samo nakon 24 h i bila je sledeća: 53,65% ćelija se nalazi u G0G1, 34,64% u S fazi, 9,84% u G2M i 1,23% u subG1 fazi ćelijskog ciklusa (Tabela 5).

Tabela 5. Distribucija kontrolnih MDA-MB-231 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa (%)

Kontrola				
Dužina tretmana (h)	Faze ćelijskog ciklusa			
	G0G1	S	G2M	subG1
24	53,65	34,64	9,84	1,23

Rezultati analize distribucije MDA-MB-231 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana DOX-om u trajanju od 24 h su bili sledeći: 50,71% ćelija se nalazi u G0/G1 fazi, 28,25% u S fazi, 20,05% u G2/M fazi i 1,36% u subG1 fazi ćeliskog ciklusa (Slika 20). Nakon 48 h tretmana DOX-om, 60,15% ćelija se nalazi u G0/G1 fazi, 26,2% se nalazi u S fazi, 11,43% u G2M fazi i 1,16% u subG1 fazi ćelijskog ciklusa (Slika 20).

Rezultati analize distribucije MDA-MB-231 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana FNP/DOX-om u trajanju od 24 h su bili sledeći: 55,84% ćelija se nalazi u G0/G1 fazi, 32,1% u S fazi, 8,58% u G2M fazi i 4,95% u subG1 fazi ćelijskog ciklusa (Slika 20). Nakon 48 h tretmana FNP/DOX zapaža se da se 59,3% ćelija nalazi u G0G1 fazi, 28,02% u S fazi, 11,8% u G2M fazi i 0,13% u subG1 fazi ćelijskog ciklusa (Slika 20).

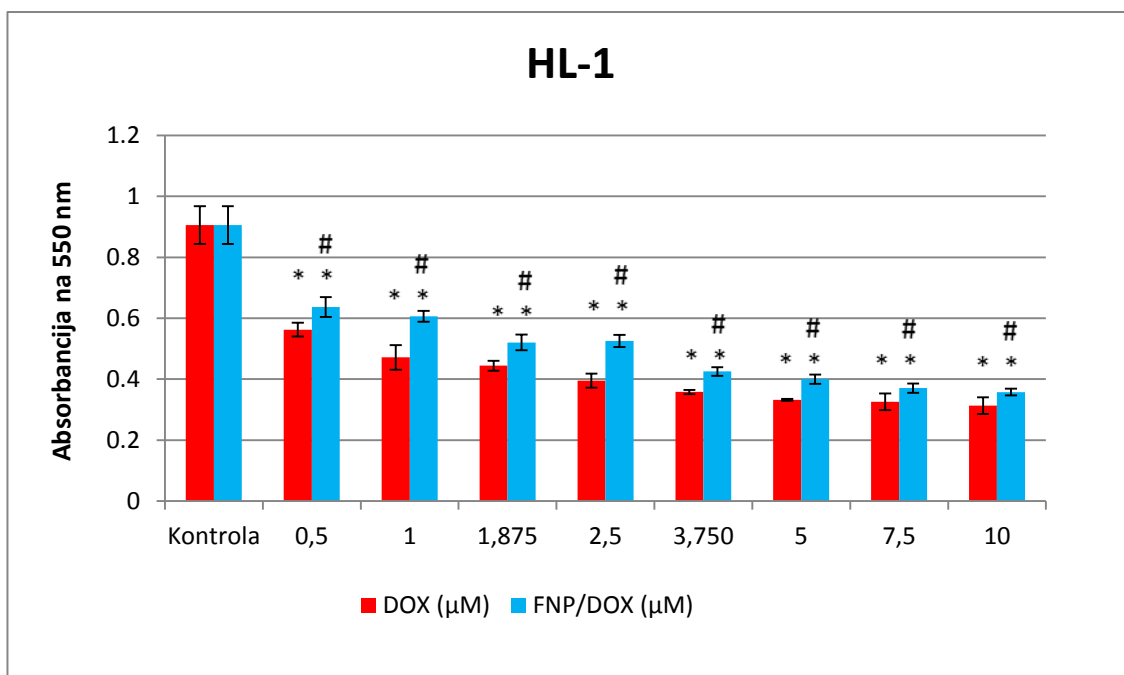


Slika 20. Distribucija MDA-MB-231 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa u nakon tretmana DOX i FNP/DOX. MDA-MB-231 su bile tretirane DOX-om i FNP/DOX-om u trajanju od 24 h i 48 h. Rezultati na histogramu su izraženi u %. M1, M2, M3 i M4 se odnose na G0/G1, S, G2/M i subG1, redom (Jović i sar., 2016).

4.1.4 Nanokompozit FNP/DOX pokazuje smanjenu citotoksičnost u odnosu na DOX na kardiomiocitima miša HL-1

Uticaj nanokompozita FNP/DOX na inhibiciju proliferacije HL-1 ćelija ispitivan je MTT metodom. Ćelije su izlagane DOX i FNP/DOX u nekoliko različitih koncentracija: 0,5, 1, 1,875, 2,5, 3,75, 5, 7,5 i 10 μM i FNP u koncentraciji od 0,111 mM, pri čemu je dužina tretmana trajala 24 h. Rezultati su pokazali da DOX i FNP/DOX smanjuju vijabilnost ćelija u svim ispitivanim koncentracijama u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe je pokazano da FNP/DOX u svim ispitivanim

koncentracijama ima značajnije manji citotoksični efekat u odnosu na DOX (Slika 21). Dozno zavisni efekti su korišćeni za računanje koncentracije supstance koja dovodi do smanjenja vijabilnosti ćelija za 50% (IC₅₀ vrednost). Rezultati su pokazali da IC₅₀ vrednost za FNP/DOX iznosi 4,89 μM a za DOX 0,54 μM. Samostalna primena FNP, pokazuje određeni citotoksični potencijal u poređenju sa kontrolnim uzorkom, ali ipak znatno manji u odnosu na DOX i FNP/DOX (rezultati nisu prikazani).

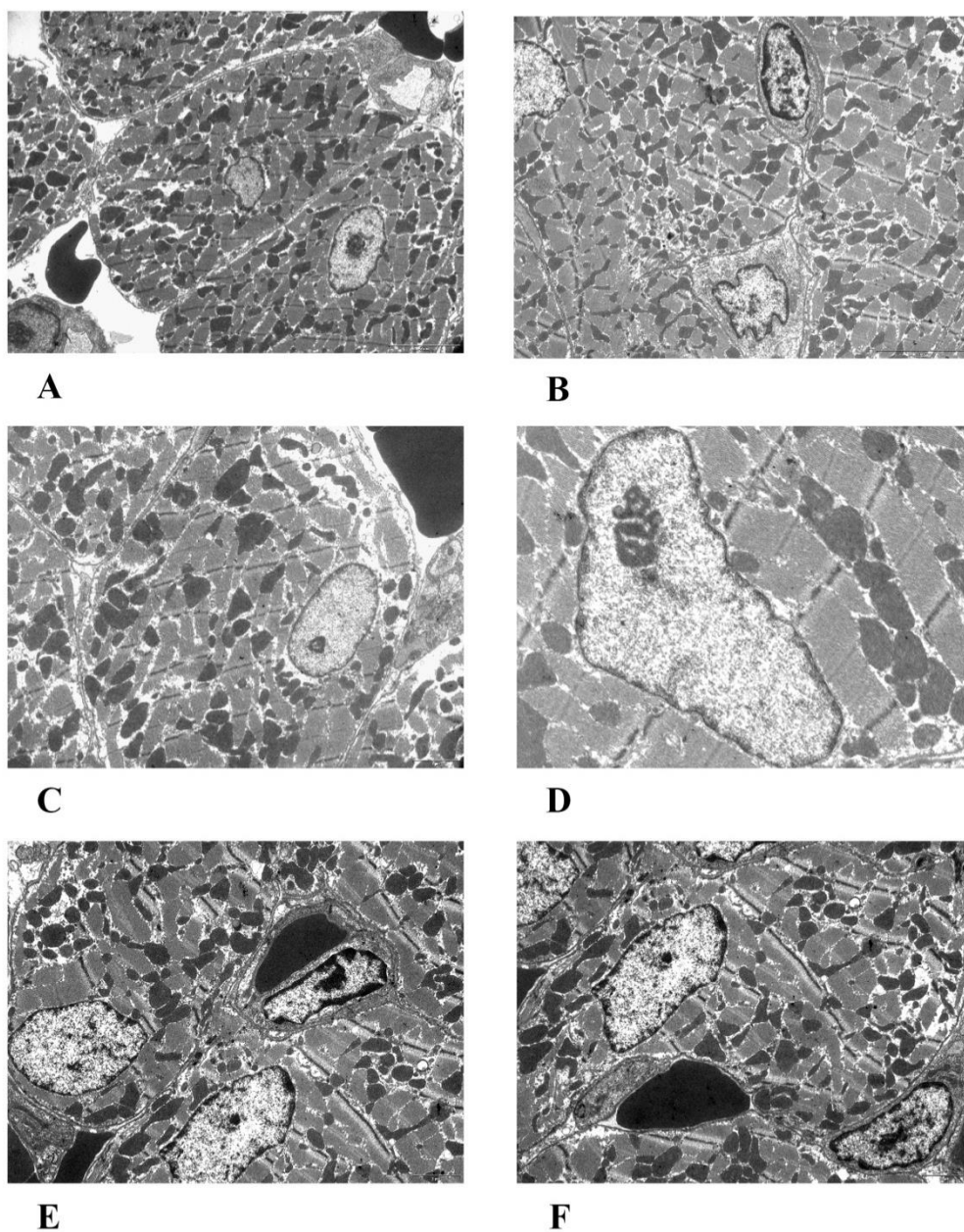


Slika 21. **Vijabilnost HL-1 ćelija nakon 24 h tretmana sa DOX-om i FNP/DOX-om.** Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost iz 3 ponavljanja ± SD. *p<0,05 u odnosu na kontrolu, # p<0,05 u odnosu na DOX

4.1.5 FNP/DOX i DOX menjaju ultrastrukturne karakteristike tkiva srca

S obzirom da je DOX u kliničkoj upotrebi već više decenija, i s obzirom da izaziva brojne štetene efekte pre svega na srcu i jetri, dalja ispitivanja delovanja DOX-a i FNP/DOX-a su rađena *in vivo*, na pacovoma soja Wistar, pri čemu je praćena ultrastruktura tkiva srca i jetre životinja.

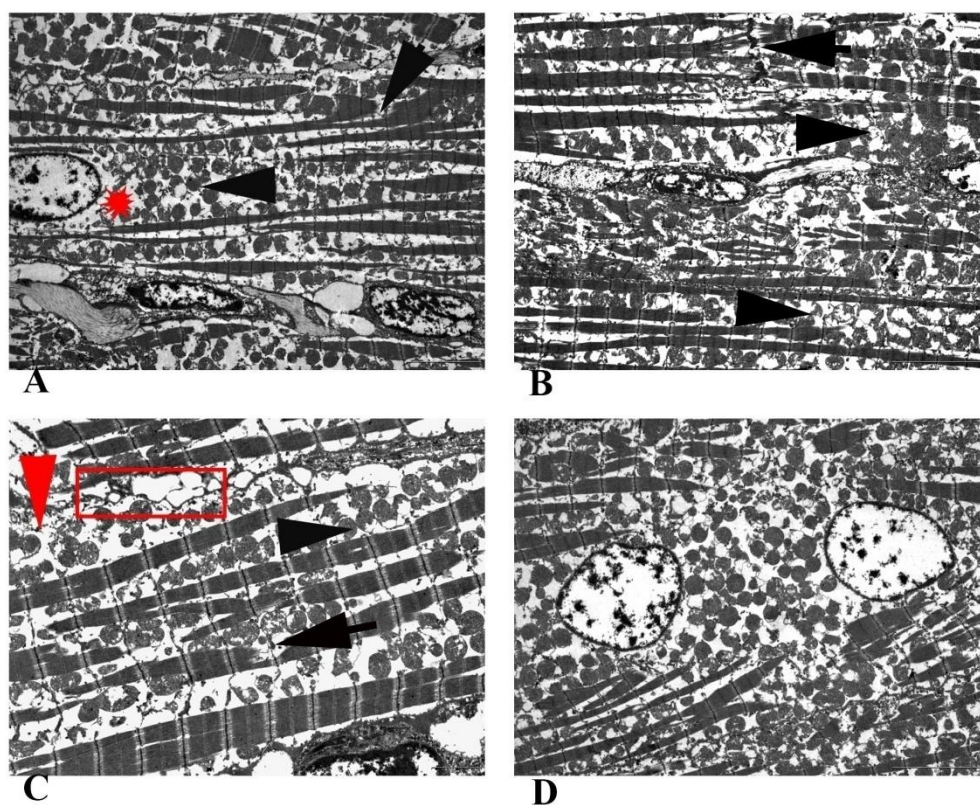
Morfologija srca kontrolne grupe pacova je prikazana na Slici 22. Ćelije srca kontrolne grupe pokazuju regularnu morfologiju, sa intaktnim mitohondrijama, regularnu distribuciju miofibrila i odsustvo kako intraćelijskog tako i intersticijalnog edema.



Slika 22. **Elektronske mikrofografije tkiva srca kontrolne grupe pacova.** Na poprečnom preseku kardiomiocita mogu se uočiti regularni aranžmani miofibrila, očuvana morfologija mitohondrija, odsustvo intraćelijskog i intersticijalnog edema. A) 3000x; bar=2 μ m, B) 3800x; bar=5 μ m; C), E) i F) 5000x; bar=2 μ m, D) 10000x, bar=2 μ m) (Seke i sar., 2016)

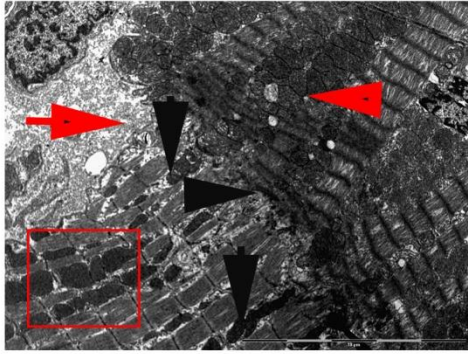
Morfologija tkiva srca grupe pacova koja je tretirana sa 0,125 mg/kg FNP-a, je bila grubo izmenjena (Slika 23). Primećen je progresivan intraćelijski edem. Miofibrili,

mada regularne strukture i aranžmana, su bili razdvojeni širokim prostorom koji je formiran usled prisustva intraćelijskog edema. Sarkolema je bila fokalno oštećena i odvojena od miofibrila. Kardiomiociti su bili vakuolizovani, pri čemu je vakuolizacija većinom poticala od cisterni sarkoplazmatskog retikuluma, kako paralelnih tako i terminalnih. U područjima gde su kardiomiociti u bočnom kontaktu primećene su proširene T-tubule, asocirane sa sarkoplazmatskim retikulumom. Struktura mitohondrija je bila poremećena usled dezintegracije kristi. Primećeno je fokalno cepanje miofibrila kao i prekinut kontinuitet interkalatnih diskova. Međutim, nije uočeno prisustvo intersticijalnog edema, hiperkontrakcija sarkomera, intersticijalne hemoragije i ekstravazacija eritrocita. Endotelne ćelije su bile edematozne, sa prisutvom fenomena kariolize.

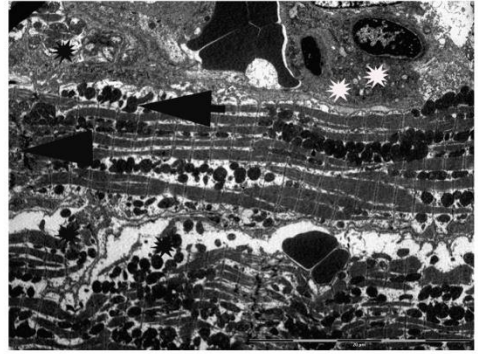


Slika 23. Elektronske mikrografije tkiva srca pacova tretiranih sa 0,125 mg/kg FNP-a. Intraćelijski edem (A - D); odvajanje sarkoleme od miofibrila (C; crvene glave strelica); vakuolizirani kardiomiociti (C; crveni pravougaonik); dezintegrisane mitohondrijalne kriste (A, B i C; crne glave strelica); cepanje interkalarnih diskova (A; crna strelica) i miofibrila (B i C; crna strelica); binuklearni kardiomiociti sa intracelularnim edemom, cepanje miofibrila i karioliza (D). A) 3000x; bar=5 μ m, B) i C) 3800x; bar=5 μ m, D) 5000x; bar=5 μ m) (Seke i sar., 2016)

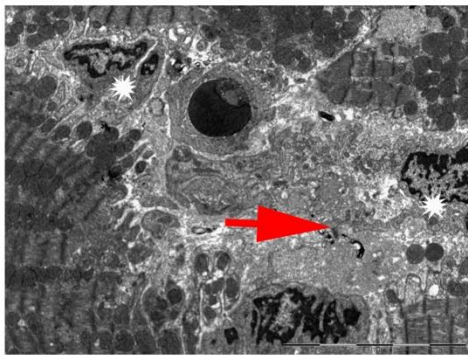
Kod grupa pacova tretiranih sa 4 mg/kg DOX-a primećen je intenzivan intersticijalni edem. Hiperkontrakcija sarkomera se ogledala u disociranim kontrakcijama sa snažnim cepanjem interkalatnih diskova. Uočava se intraćelijski edem i vakuolizacija kardiomiocita sa bubrenjem sarkoleme. Bez obzira na to, prisutan je bio skoro jednak broj kardiomiocita sa kondenzovanom citoplazmom i marginalizovanim hromatinom. Mitohondrije su bile fokalno edematozne sa svetlim matriksom i blago proširenim kristama. Takođe su bile prisutne mitohondrije sa elektron-gustim matriksom i mijelinskim figurama. Pored toga, primećeno je i prisustvo pojedinih mitohondrija iregularnog oblika kao i megamitohondrije nastale usled fuzije nekoliko mitohondrija. Fokalno je ustanovljeno i prisustvo oštećenja na sarkolemi koja su omogućila pasivnu migraciju eritrocita u kardiomiocite vodeći ka fenomenu sličnom emperipolezi. Dalje je uočena apoptoza endotelijalnih ćelija i intersticijalnih fibroblasta zajedno sa ekstravazacijom eritrocita i intersticijalnom hemoragijom. Ostaci endotelijalnih ćelija i fibroblasta u apoptozi su viđeni u intersticijalnom tkivu ukazujući na povećan obim apoptoze (Slika 24).



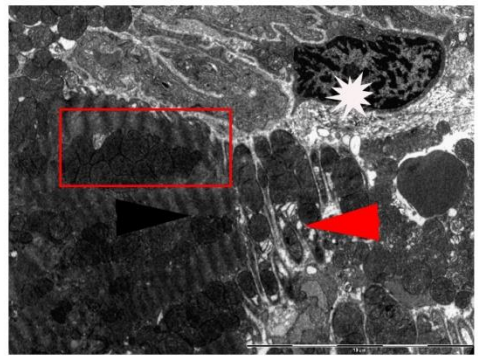
A



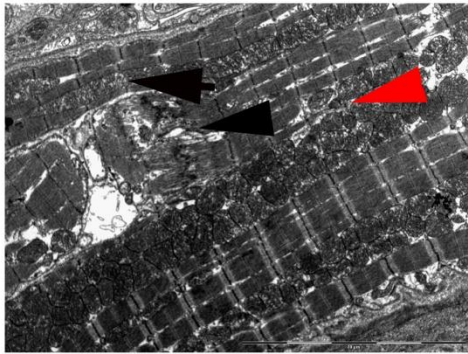
B



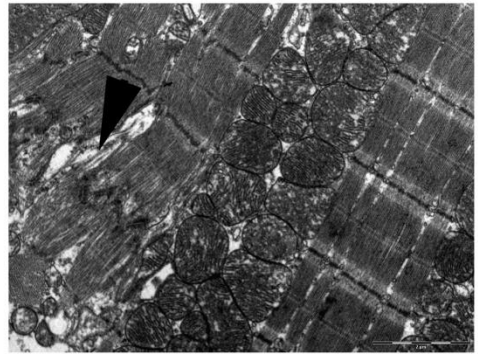
C



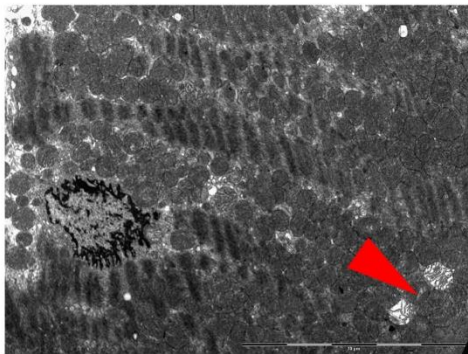
D



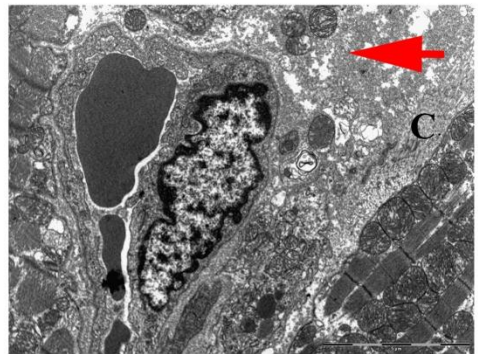
E



F



G



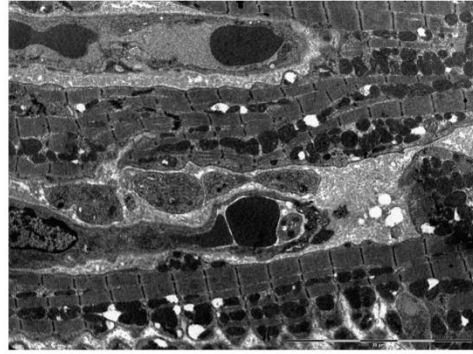
H

Slika 24. Elektronske mikrografije tkiva srca pacova tretiranih sa 4 mg/kg DOX-a. Intenzivan intersticijalni edem (A, C, i H; crvene glave strelica); intenzivna hiperkontrakcija sarkomera sa cepanjem interkalatnih diskova (A i B; crne glave strelica); cepanje interkalatnih diskova (E i F; crne glave strelica); vakuolizovani kardiomociti i bubrenje ćelijske membrane (B; crne zvezdice); ekstravazacija intersticijalnih eritrocita i hemoragija (B); eritrociti unutar kardiomocita - fenomen sličan emperipolezi (B); apoptoza endotelijalnih ćelija i intersticijalnih fibroblasta (B, C i D; bele zvezdice); ostaci intersticijalnih ćelija - prepoznatljive po prisustvu kolagenih vlakana (C) okružene membranama definisanih ćelija, relativno očuvani krvni sudovi, mitohondrije sa neregularnim cirkularnim kristama, proširenim kristama ili sa elektron-gustim matriksom, mijelinske figure (H); fokalno edematozne mitohondrije sa svetlim matriksom i proširenim kristama (E i G; crvene glave strelica); mitohondrije sa elektron-gustim matriksom (A i D; crveni kvadrat); neregularan oblik mitohondrija usled fuzije (A i B; crne strelice); megamitohondrije nastale usled fuzije (E; crna strelica); kondenzacija citoplazme sa hiperkontrakcijom sarkomera i perifernim depozicijama heterohromatina (G). A), D), E) i G) 4400 x; bar=10 µm, B) 2200 x; bar=20 µm, C) 3500 x; bar=10 µm, F) (8900 x; bar=2 µm, H) 5600 x; bar=5 µm) (Seke i sar., 2016)

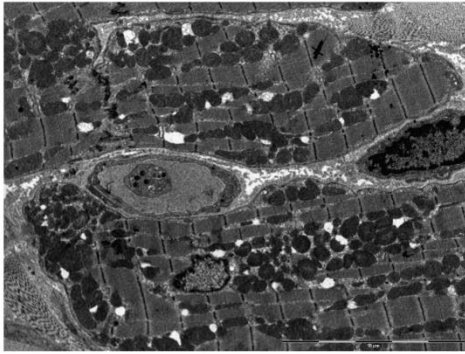
Kod životinje tretiranih sa 4 mg/kg FNP/DOX se uočavaju kardiomociti očuvane strukture sa regularno pozicioniranim miofibrilima, euhromatskim jedrima i sintetski aktivnim jedarcima. Nema znakova intraćelijskog edema. Međutim, prisutan je intersticijalni edem. Uočena vakuolizacija uglavnom potiče od edematoznih mitohondrija. Fokalno su prisutne grupe mitohondrija sa elektron-gustim matriksom. Ono što je specifično primećeno samo u ovoj grupi jeste adhezija i agregacija brojnih trombocita na zidovima krvnih sudova. Druge ćelije krvi, kao na primer neutrofili, takođe su imali tendenciju da adheriraju za endotelijalne ćelije. Apoptoza endotelijalnih ćelija i vakuolizacija sugerišu prisustvo onkoze koja je primećena samo fokalno (Slika 25).



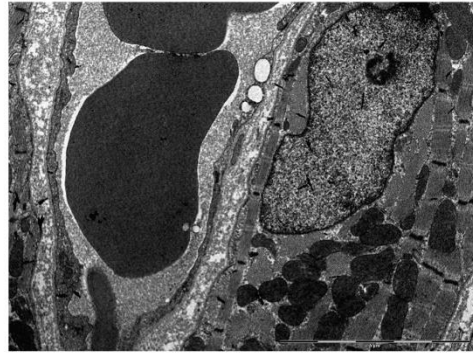
A



B



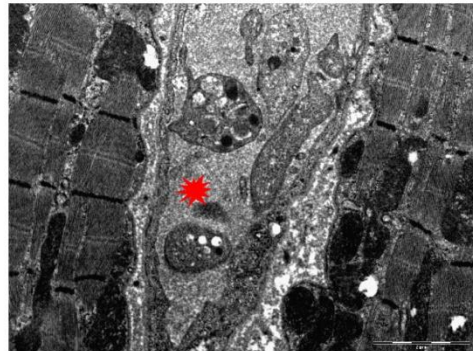
C



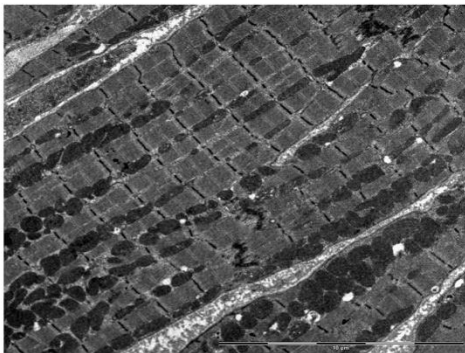
D



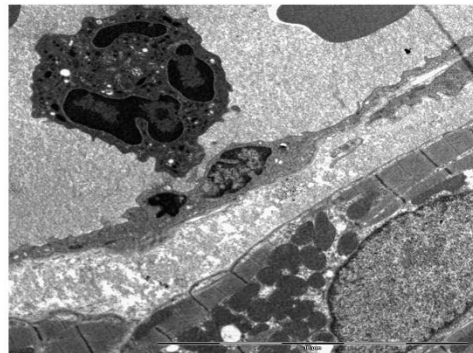
E



F



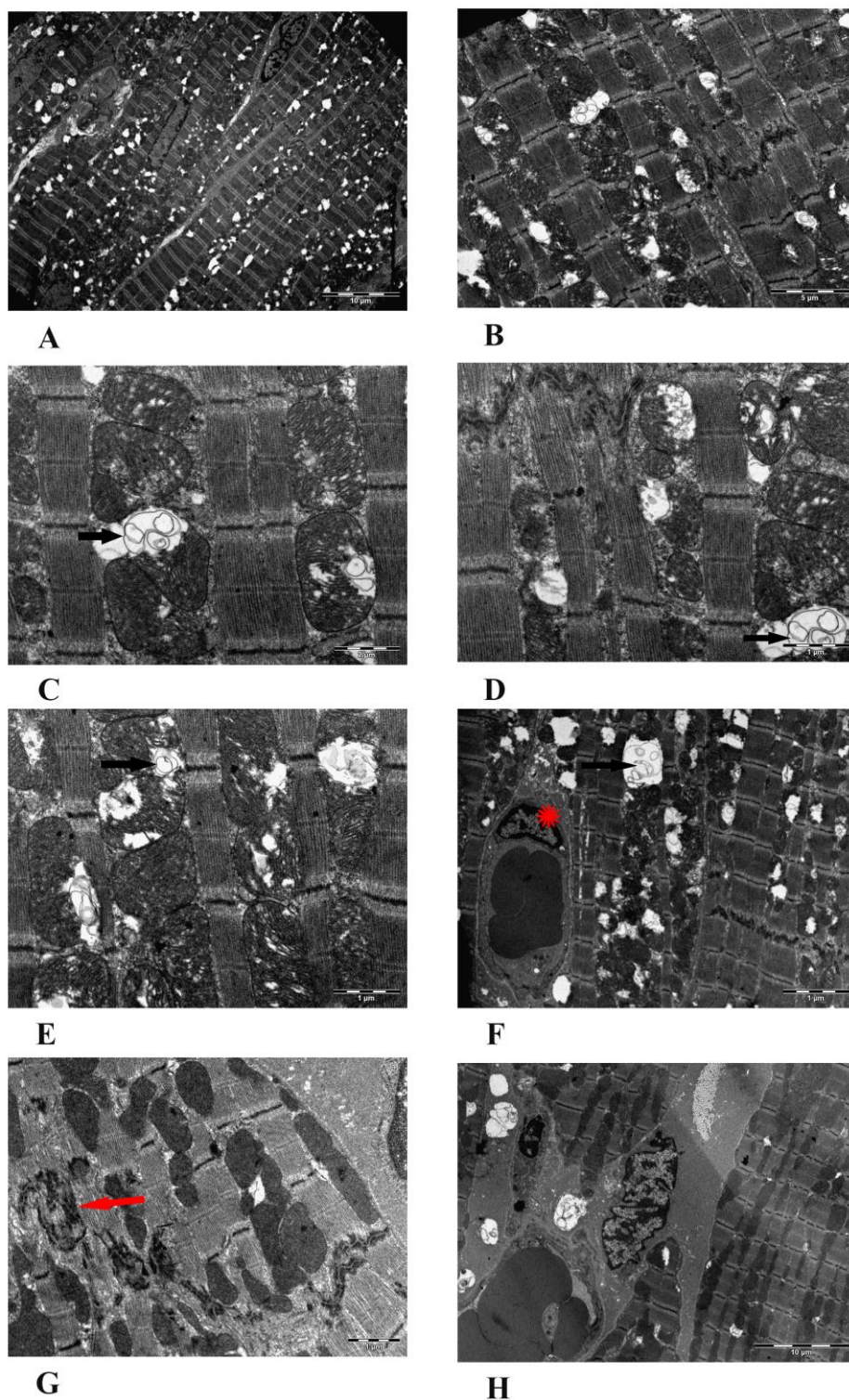
G



H

Slika 25. Elektronske mikrografije tkiva srca pacova tretiranih sa 4 mg/kg FNP/DOX. Regularne strukture i aranžmani miofibrila (A - G); intersticijalni edem (B, C i E; crvene glave strelica na E); vakuolizacija kao proizvod edematoznih mitohondrija (A - H); vakuolizacija endotelijalnih ćelija (D); adhezija i agregacija brojnih trombocita za zid krvnih sudova (F; crvena zvezda); adheriranje neutrofila na endotelijalnim ćelijama (H); apoptoza endotelijalnih ćelija (H). A) 2200 x; bar=20 µm, B), C) i G) 3500 x; bar=10 µm, D) i E) 7100 x; bar=5 µm, F) 8900 x; bar=2 µm, H) 4400 x; bar=10 µm. (Seke i sar., 2016)

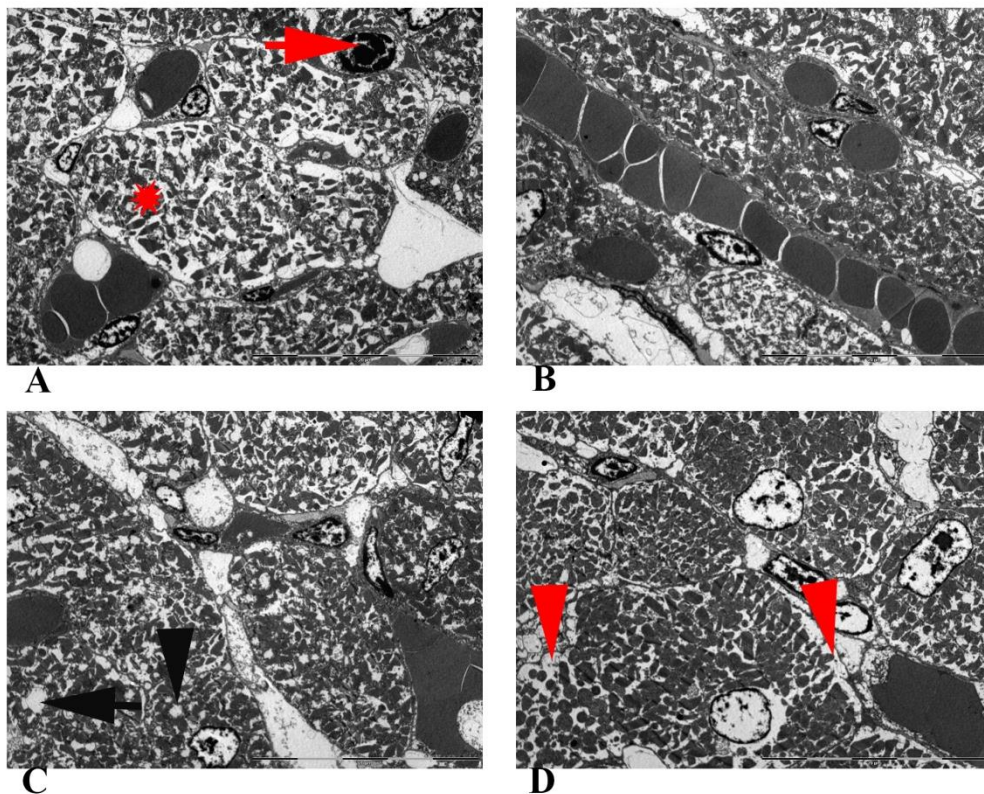
Kod životinja tretiranih sa 2 mg/kg DOX-a nije bilo znakova intracelularnog edema. Mitohondrije su nabubrele sa oštećenim kristama koje su organizovane u mijelinske figure. Međutim, prisutan je intenzivan intersticijalni edem. Kod endotelijalnih ćelija je primećena marginalizacija hromatina kao i apoptoza endotelijalnih ćelija i fibroblasta. Interkalatni diskovi su odvojeni, dok prisustvo ekstravazacije eritrocita nije primećeno (Slika 26).



Slika 26. **Elektronske mikrografije tkiva srca pacova tretiranih sa 2 mg/kg DOX-a.** Bez intracelularnog edema (A i B); nabubrele mitohondrije sa oštećenim i dezorganizovanim kristama u formi mijelinskih figura (C – F; crne strelice); intenzivan intersticijalni edem (H); marginalizacija hromatina kod endotelijalnih ćelija (F; crvena

zvezdica); apoptoza endotelnih i intersticijalnih ćelija (H); oštećeni interkalatni diskovi (G; crvena strelica). A) 1800 x; bar=10 µm, B) 7100 x; bar=5 µm, C), D) i E) 14000 x; bar=1 µm, F) 4400 x; bar=1 µm); G) 8900 x; bar=1 µm, H) 3500 x; bar=10 µm) (Seke i sar., 2016)

Morfologija tkiva srca životinja tretiranih sa 2 mg/kg FNP/DOX je bila grubo poremećena slično kao kod životinja tretiranih sa FNP. Osim intenzivnog intraćelijskog edema, kardiomiociti su vakuolizovani kao posledica vakuolizacije sarkoplazmatičnog retikuluma i mitohondrija. U mitohondrijama su uočena dezintegracija kristi. Pored toga, endotelijalne i intersticijalne ćelije su edematozne i predstavljaju onkotičke promene. Međutim, nema prisustva intersticijalnog edema kao ni hiperkontrakcije sarkomera. Takođe, nije primećena intersticijalna hemoragija kao ni ekstravazacija eritrocita. U edematoznim endotelijalnim ćelijama su uočeni fenomeni kariolize i kariorekse. Krvni sudovi su prošireni i ispunjeni eritrocitima (Slika 27).



Slika 27. Elektronske mikrografije tkiva srca pacova tretiranih sa 2 mg/kg FNP/DOX-a. Intraćelijski edem (A - D); vakuolizovani kardiomiociti gde vakuolizacija većinom potiče od sarkoplazmatičnog retikuluma (C; crna strelica) i mitohondrija; dezintegracija mitohondrijalnih krsti (C; crna glava strelice); edematozne i vakuolizovane endotelijalne ćelije (A; crvena zvezdica) sa prisustvom kariorekse i

kariolize (A; crvena strelica); staza krvi u krvnim sudovima (B); odvajanje sarkoleme od miofibrila (D; crvene glave strelica). A) - D) 2200 x; bar=20 µm. (Seke i sar., 2016)

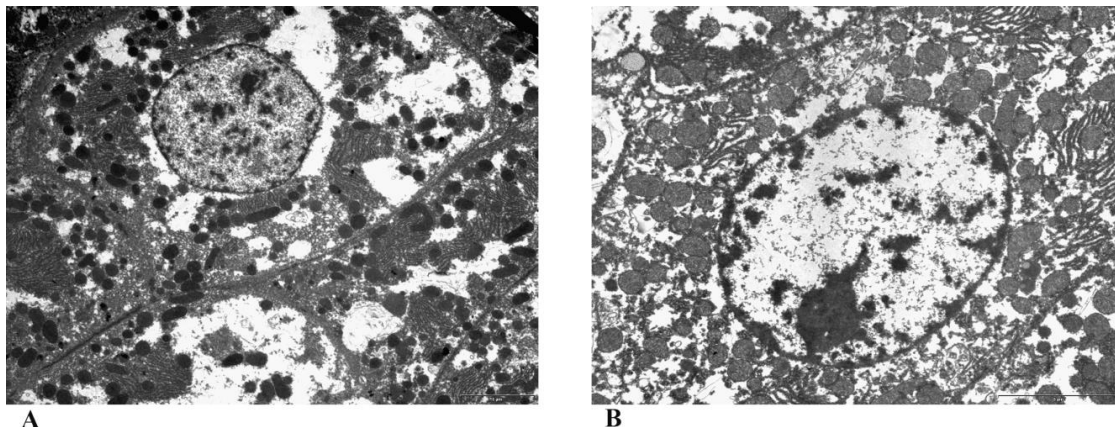
Sve primećene i opisane strukturne modifikacije ćelija, intersticijalne promene i prisustvo ćelijske smrti u odnosu na tretmane, sumirane su u Tabeli 6.

Tabela 6. Upporedna analiza morfologije tkiva srca životinja svih eksperimentalnih grupa

Grupe	Intraćelijski edem	Vakuolizacija	Karioliza, karioreksa	Oštećeni interkalatni diskovi	Mijelinske	Oštećenje mitohondrija	Intersticijalni edem	Različite forme ćelijske smrti ednoteijjalnih ćelija	Ekstravazacija eritrocita, intersticijalna hemoragija	Hiperkontrakcija sarkomera	Adhezija i agregacija trombocita
Kontrola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FNP 0,125 mg/kg	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
DOX 4 mg/kg	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
FNP/DOX 4 mg/kg	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+
DOX 2 mg/kg	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
FNP/DOX 2 mg/kg	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-

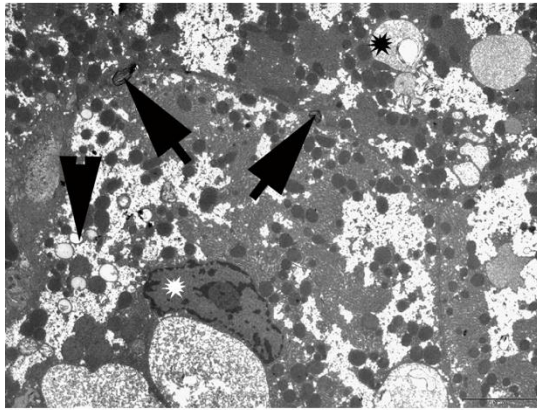
4.1.6 FNP/DOX i DOX menjaju ultrastrukturne karakteristike tkiva jetre

Takođe je analizirana ultrastruktura tkiva jetre kod životinja koji se bile tretirane sa FNP-om, DOX-om i FNP/DOX-om. Morfologija jetre kontrolne grupe pacova je prikazana na Slici 28. Ćelije jetre kontrolne grupe pokazuju regularnu morfologiju, sa intaktnim ćelijskim strukturama.

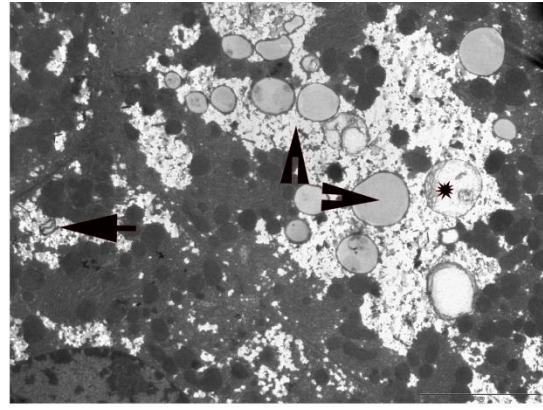


Slika 28. **Elektronske mikrografije tkiva jetre kontrolne grupe pacova soja Wistar.** A) 2650x; bar=5 µm, B) 4400x; bar=5 µm (Petrovic i sar., 2018)

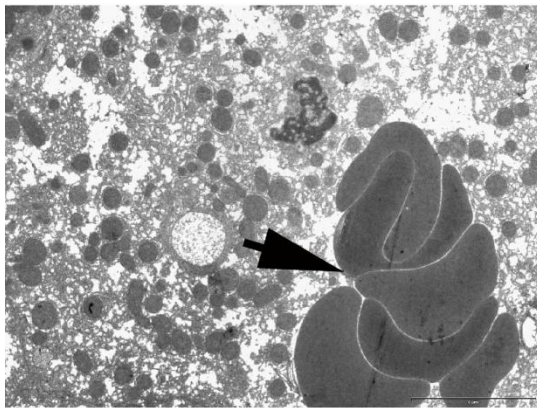
Analiza morfologije jetre, u grupi tretiranoj sa FNP-om pokazala je promene fokalnog karaktera (Slika 29). Pod elektronskim mikroskopom se vide područja sa oštećenim hepatocitima isprepletana sa zonama očuvanih hepatocita. Zapažena je i mitozna hepatocita. Mijelinske figure, mikrovezikularne masne promene i autofagne vakuole su takođe primećene u hepatocitima kao i kondenzacija jedra. Prisutne su i mitohondrije sa povećanom elektronskom gustinom, neregularne veličine i sa ekstremnim varijacijama u svojoj veličini. Apoptoza endotelnih ćelija praćena je oštećenjem kapilara i intersticijalnom hemoragijom kao i apoptozom intersticijalnih ćelija (Itovih u Kupferovih). Zapažen je i fenomen emperiopoleze sa eritrocitima prisutnim duboko u citoplazmi hepatocita.



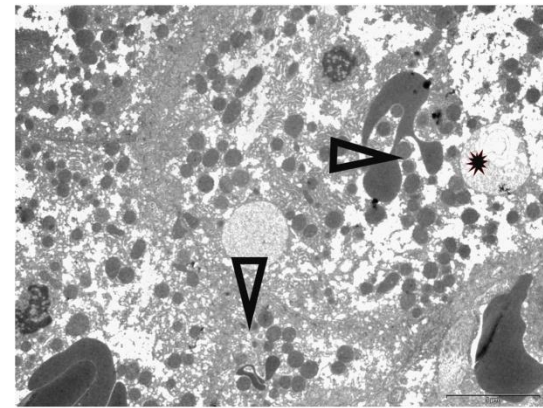
A



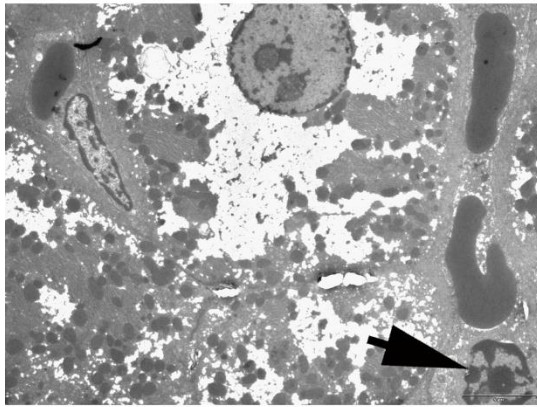
B



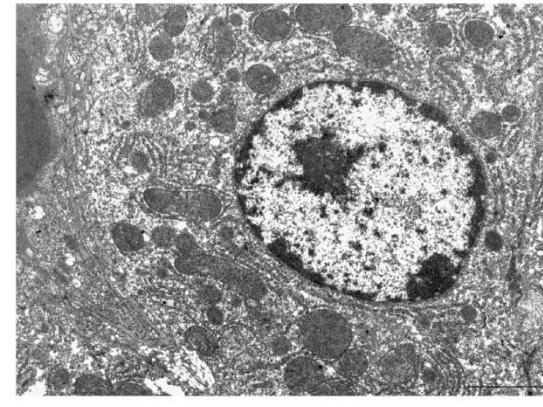
C



D



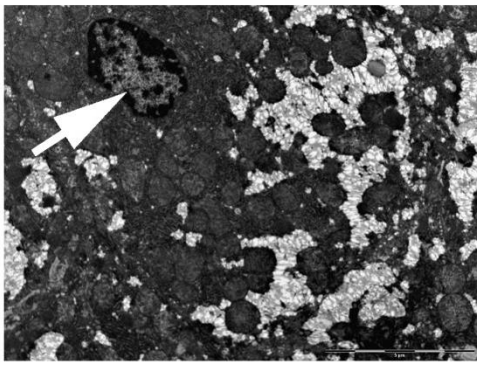
E



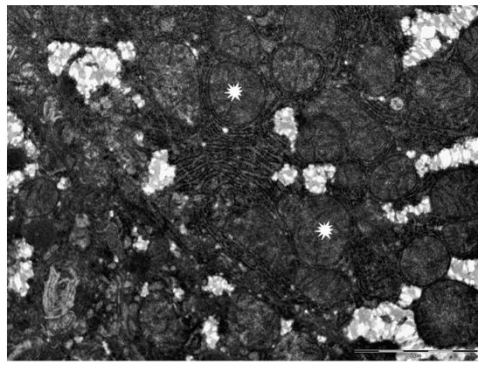
F

Slika 29. **Elektronske mikrografije tkiva jetre pacova tretiranih sa 0,125 mg/kg FNP.** Primećene su sledeće promene u tkivima jetre: mikrovezikularne masne promene (A, B and D; glave strelica); autofagozomi (A, B i D; zvezdice); mijelinske figure (A i B; strelice); kondenzacija hromatina u jedru (A; bela zvezdica); povećana elektronska gustina i varijacije u veličini mitohondrija (A, B, C, E i F); kondenzacija hromatina sa naznakama apoptoze endotelnih ćelija (E; strelica); intersticijalna hemoragija (D; glave strelica); emperiopoleza (C; strelica). A), D) i E) 2650x; bar=5 μm , B) and C) 4400x; bar=5 μm , F) 7100x; bar=2 μm (Petrovic i sar., 2018)

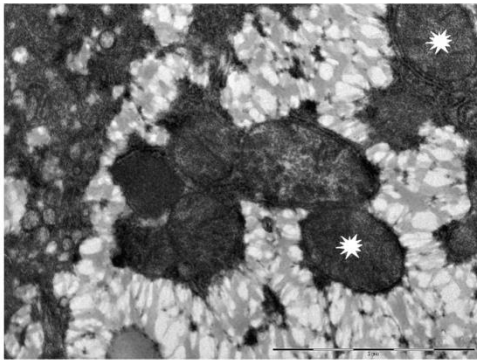
U hepatocitima životinja koje su tretirane DOX-om u dozi od 4 mg/kg (Slika 30) su primećene mikrovezikularne masne promene i mijelinske figure. Ultrastrukturalna analiza je pokazala i apoptozu hepatocita. Mitohondrije, sa elektron-gustim matriksom i oštećenim kristama su takođe bile uočljive. Mitohondrije su bile prisutne i u formi megamitohondrija, verovatno usled fuzije regularnih mitohondrija. Pored toga, primećen je i fenomen emperiopoleze sa dubokim migracijama eritrocita u citoplazmu hepatocita. Zapažena su i oštećenja kapilara sa apoptozom endotelnih ćelija, praćena intersticijalnom hemoragijom.



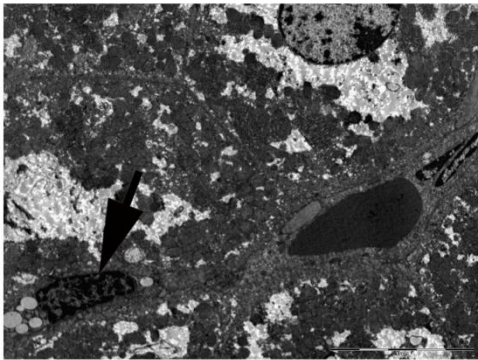
A



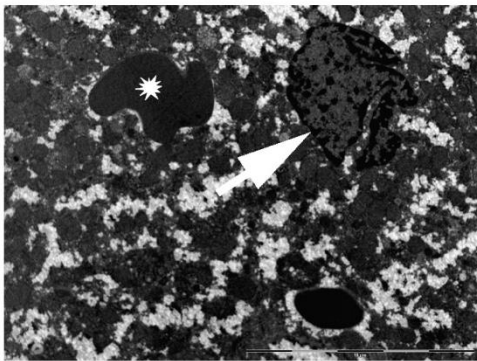
B



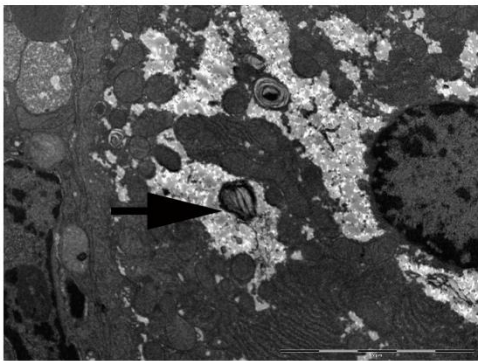
C



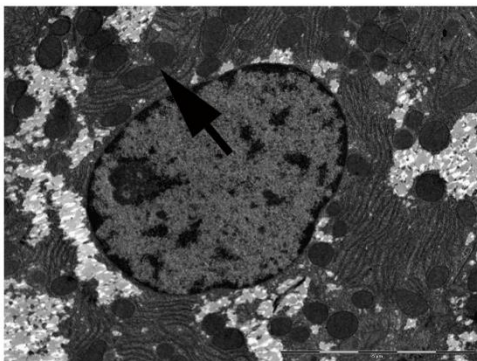
D



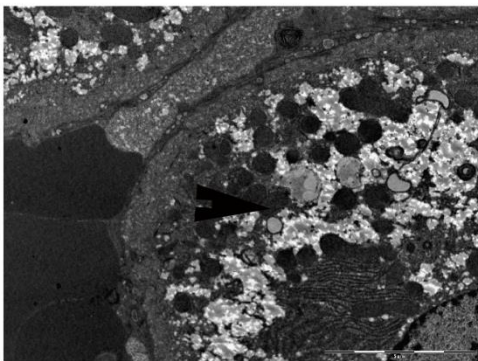
E



F



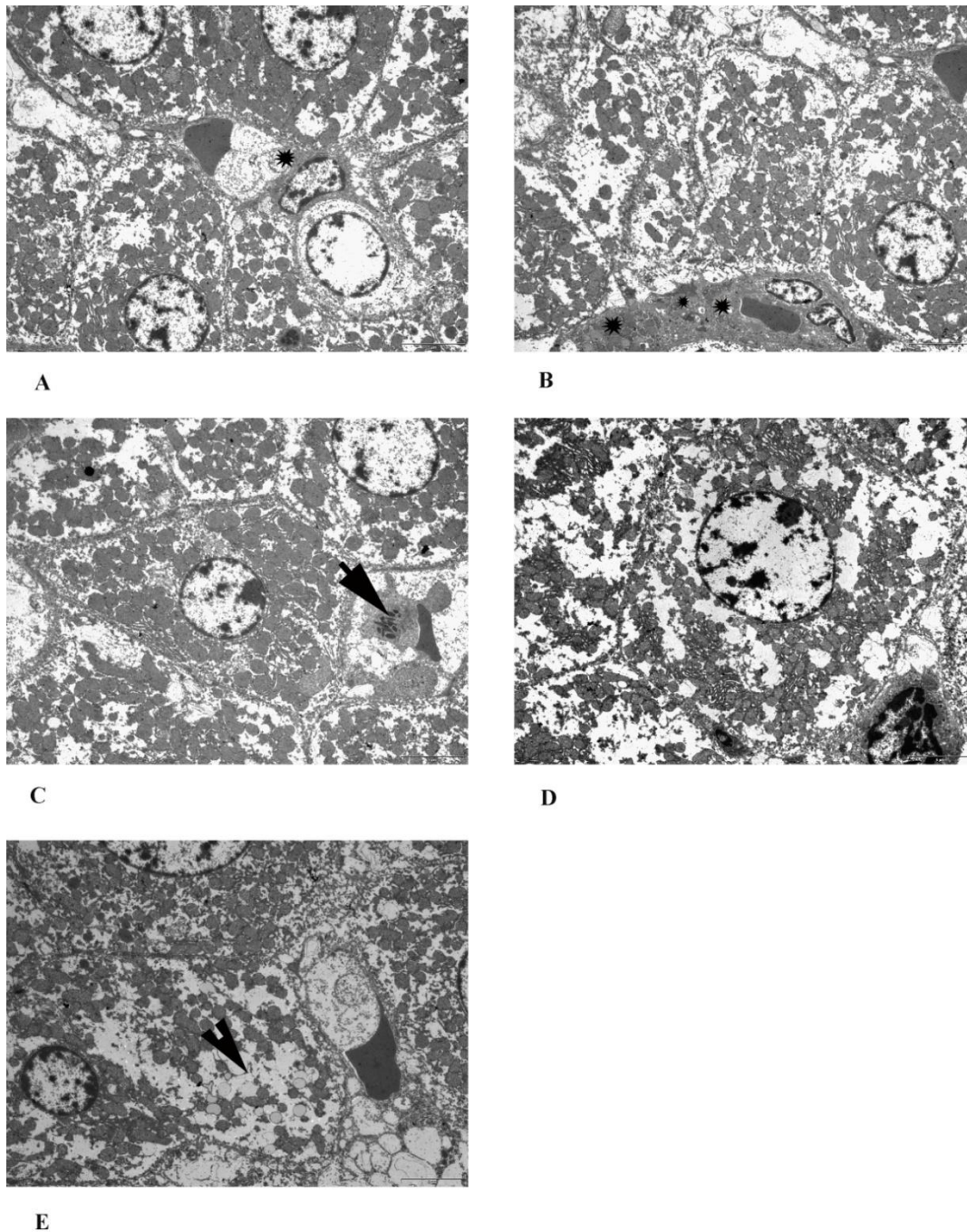
G



H

Slika 30. Elektronske mikrografije tkiva jetre pacova tretiranih sa 4 mg/kg DOX. Na slikama se mogu uočiti: difuzne mikovezikularne masne promene (H; glave strelica); mijelinske figure u hepatocitima (F; strelice); mitohondrije sa elektronski gustim matriksom i oštećenim kristama (B i C; bele strelice); mitohondrije neregularne veličine i megamitohondrije (G; strelice); kondenzacija hromatina sa apoptozom hepatocita (A i E; bela strelica); apoptoza endotelних ćelija sa intersticijalnom hemoragijom (D; strelica); difuzna oštećenja kapilara i intersticijalna hemoragija (H); emperiopoleza (E; bela zvezdica). A) i H) 5600x; bar=5 µm, B) 11000x; bar=5 µm, C) 18000x; bar=2 µm, D) 2800x; bar=10 µm, E) 4400x; bar=10 µm, F) i G) 7100x; bar=5 µm, H) 5600x; bar=5 µm. (Petrovic i sar., 2018)

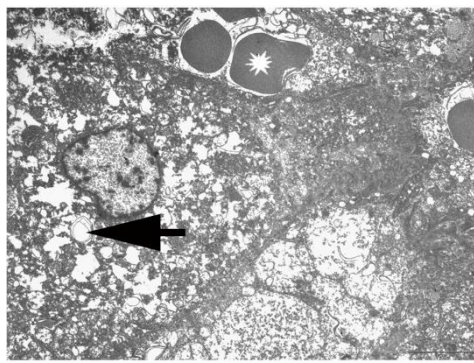
U grupi životinja, tretiranoj sa 4 mg/kg nanokompozita FNP/DOX, takođe je došlo do promena u morfologiji jetre (Slika 31). Naime, uočen je intracelularni edem i vakuolizacija endotelnih ćelija. Dalje je primećena i vakuolizacija hepatocita sa fokalno prisutnim mikovezikularnim masnim promenama. Pored apoptoze endotelnih ćelija i intersticijalne hemoragije, uočena je jedinstvena pojava vezana samo za ovu tretiranu grupu koja se ogleda u prisustvo depozicija fibrina i krvnih pločica. Takođe su bili prisutni i autofagozomi. Znakovi ciroze nisu uočeni. Većina ćelija je bila dobro očuvana, sa euhromatskim jedrima sa jednim ili dva jedarceta, dok je granulirani endoplasmatični retikulum bio vidno prisutan.



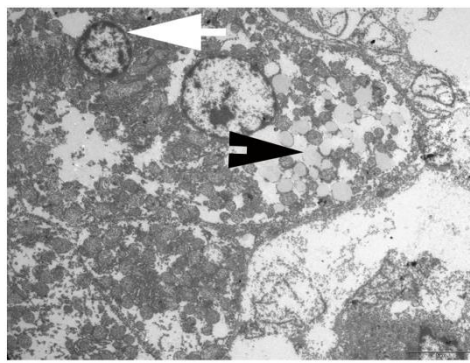
Slika 31. Elektronske mikrografije tkiva jetre pacova tretiranih sa 4 mg/kg FNP/DOX. Intracelularni edem (A - E); vakuolizacija (E); fokalne mikrovezikularne masne promene (E; glava strelice); edem, vakuolizacija i apoptoza endotelnih ćelija (A; crna zvezdica); apoptoza endotelnih ćelija i intersticijalna hemoragija sa depozicijama fibrin i platela (C; strelica); autofagozomi endotelnih ćelija (B; zvezdice). A)- E) 2650x; bar=5 μ m (Petrovic i sar., 2018)

Grupa tretirana sa DOX u dozi 2 mg/kg prikazana je na Slici 32. Poremećene membrane, organizovane u formi mijelinskih figura, su bile vidljive kod hepatocita i endotelijalnih ćelija. Takođe su uočene mikrovezikularne masne promene, a prisutni su

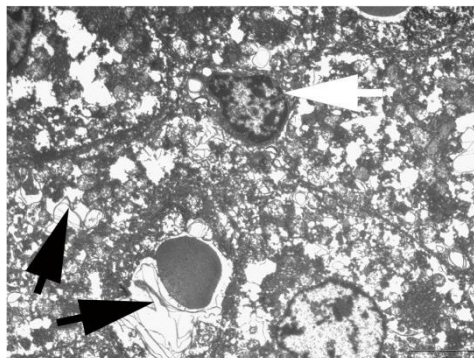
bili i znaci intracelularnog edema i vakuolizacije hepatocita. S obzirom da su promene bile fokalnog karaktera, većina hepatocita je bila očuvana dok su pojedini bili apoptotični ili sa odmaklom nekrozom. Ustanovljene su i difuzne povrede kapilara sa prisustvom autofagije, apoptoze i onkoze endotelnih ćelija, kao i prisustvo intersticijalne hemoragije.



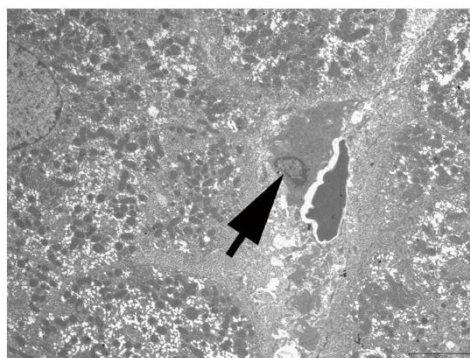
A



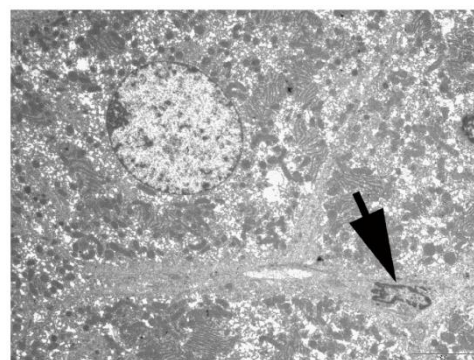
B



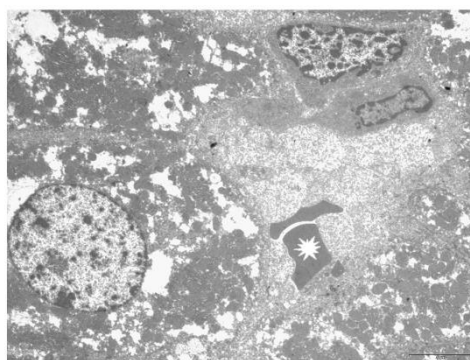
C



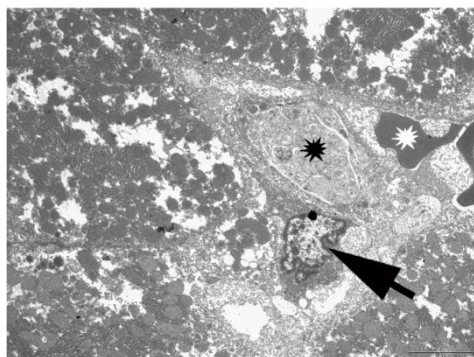
D



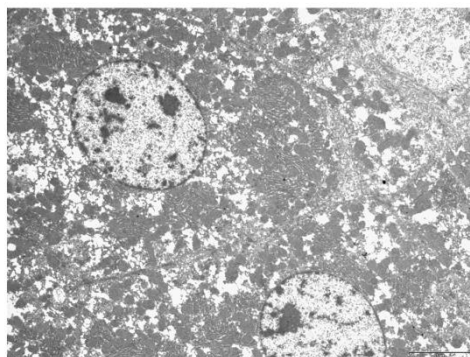
E



F



G

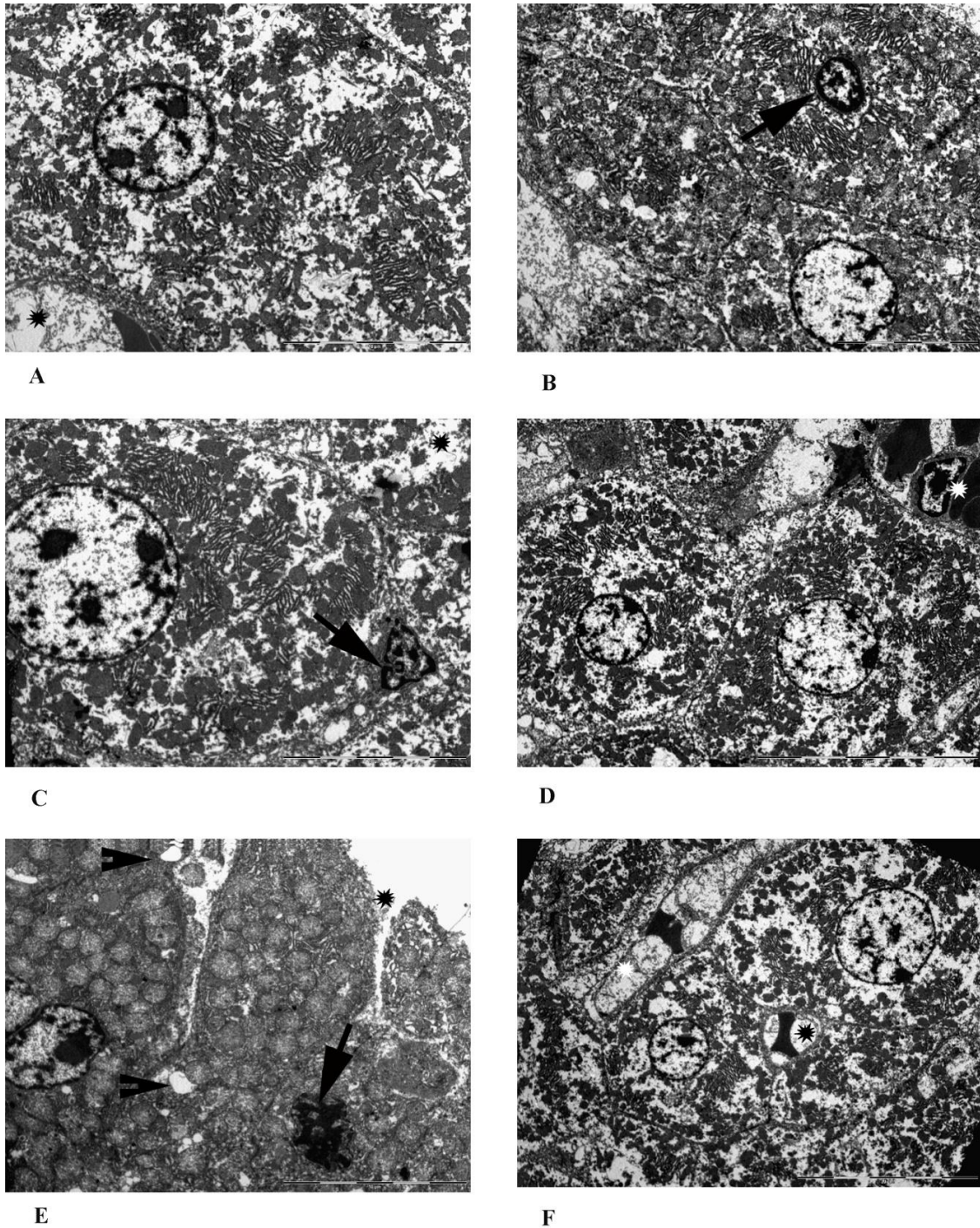


H

Slika 32. Elektronske mikrografije tkiva jetre pacova tretiranih sa 2 mg/kg DOX-
a. Intracelularni edem i vakuolizacija hepatocita (A i C; crne strelice);

mikrovezikularne masne promene (B; crna glava strelice); mijelinske figure kod hepatocita i endotelних ćelija (A i C; crne strelice); kondenzacija hromatina u jedru hepatocita (B i C; bele strelice); Kondenzacija hromatina sa apoptozom endotelних ćelija (D, E i G; crne strelice); onkoza endotelних ćelija sa intersticijalnom hemoragijom (A, F i G; bele zvezdice); autofagija endotelних ćelija (G; crna zvezdica). A)– H) 2650x; bar=5 μ m) (Petrovic i sar., 2018)

Tkivo jetre, u grupi životinja tretiranih nanokompozitom FNP/DOX u dozi od 2 mg/kg, nakon ultrastrukturne analize (Slika 33), pokazalo je prisustvo malog intracelularnog edema i vakuolizacije, kao i prisustvo lipidnih kapljica. Oblik ćelija je ostao očuvan, jedra su zadržala euhromatinsku strukturu sa jednim ili dva jedarceta, dok je granulirani endoplazmatični retikulum bio vidljivo prisutan. Uočena je apoptoza pojedinih hepatocita kao i edem, vakuolizacija i apoptoza endotelних ćelija. Ustanovljeno je i prisustvo mitoze kod pojedinih hepatocita. Nije bilo znakova fibroze ili ciroze.



Slika 33. Elektronske mikrografije tkiva jetre pacova tretiranih sa 2 mg/kg FNP/DOX-a. Intracelularni edem i vakuolizacija (A, C, E i F; crne zvezdice), retke lipidne kapljice (E; glava strelice); kondenzacija hromatina jedra i početak apoptoze (B i C; crna strelica); mitozna hepatocita (E; crna strelica); edem, vakuolizacija i apoptoza endotelnih ćelija (D i F; bela zvezdica). A), C) i E) 3500x; bar=5 μ m); B) 2800x; bar=10 μ m); D) 2200x; bar=20 μ m); F) 1800x; bar=20 μ m) (Petrovic i sar., 2018)

Sve primećene i opisane strukturne modifikacije ćelija jetre, intersticijalne promene i prisustvo ćelijske smrti u odnosu na tretmane, sumirane su u Tabeli 7.

Tabela 7. Uporedna analiza morfologije tkiva jetre životinja svih eksperimentalnih grupa

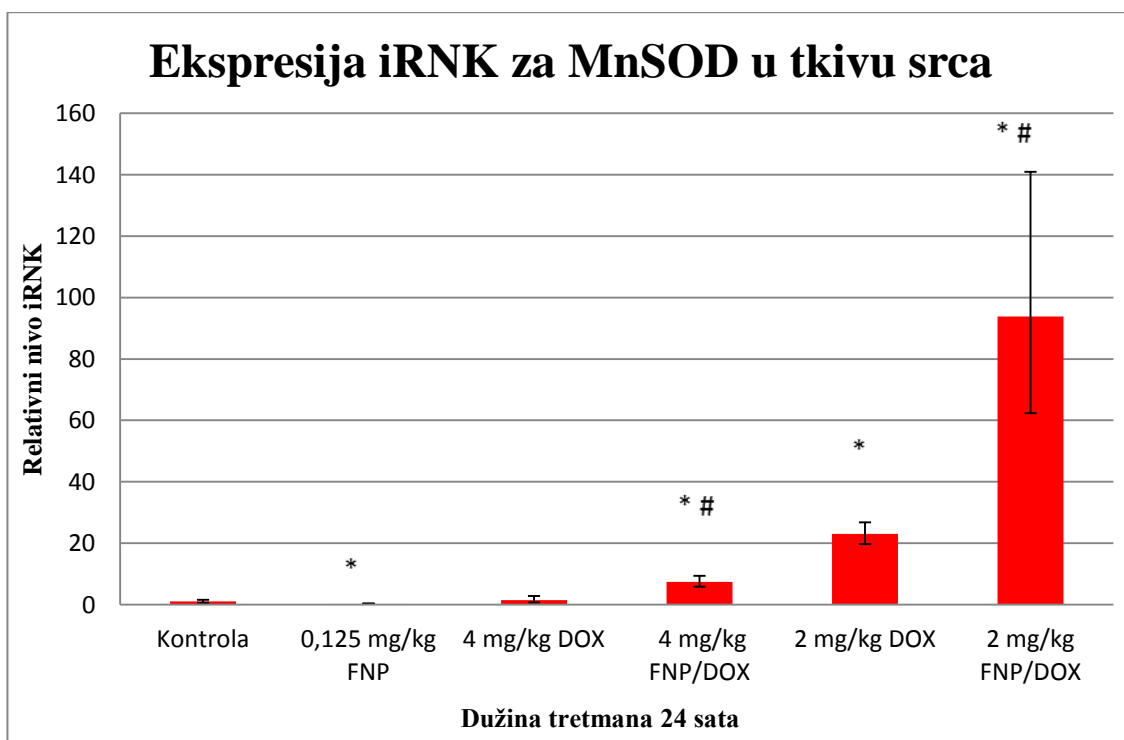
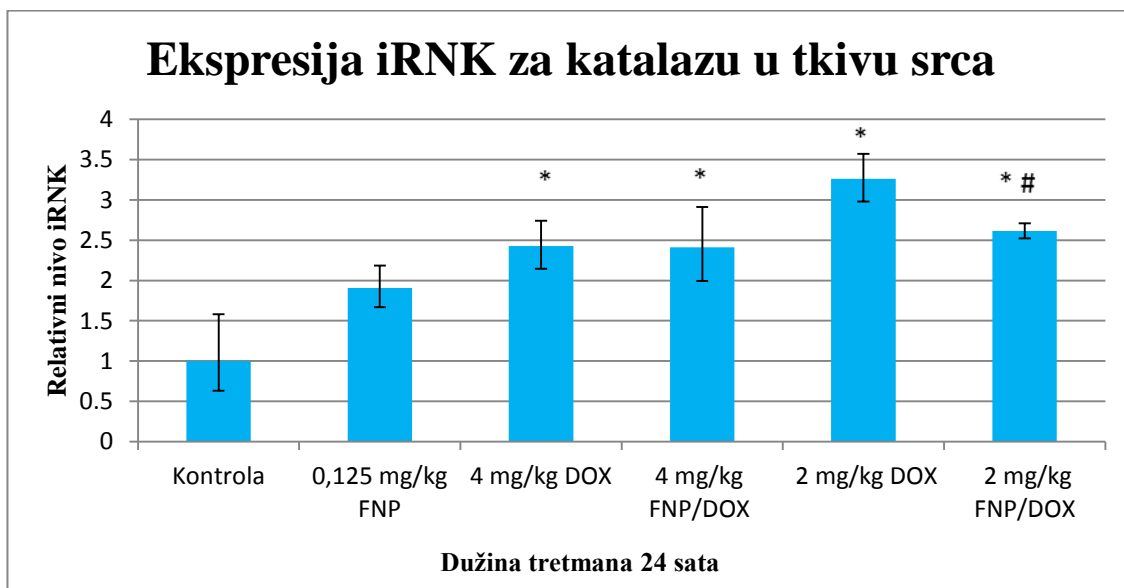
Grupe	Intraćelijski edem	Vakuolizacija hepatocita	Apoptoza hepatocita	Mikrovezikularne masne promene	Mijelinske fibrine	Oštećenje mitohondrija	Autofagozomi	Apoptoza ednotelijalnih ćelija	Oštećenje kapilara i intersticijalna hemoragija	Emperipolesis	Depozicija fibrina i krvnih pločica
Kontrola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FNP 0,125 mg/kg	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
DOX 4 mg/kg	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
FNP/DOX 4 mg/kg	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
DOX 2 mg/kg	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
FNP/DOX 2 mg/kg	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-

4.1.7 DOX i FNP/DOX menjaju ekspresiju katalaze i MnSOD u srcu pacova

U cilju provere da li DOX i FNP/DOX menjaju nivo ekspresije enzima uključenih u oksidativni stres, izvršena je kvantifikacija iRNK dva antioksidativna gena, katalaze i MnSOD, u tkivu srca kod životinja tretiranih sa dve doze DOX-a i FNP/DOX-a (2 mg/kg i 4 mg/kg). Rezultati su pokazali da je nivo iRNK za katalazu bio statistički značajno povećan nakon tretmana sa obe doze DOX i FNP/DOX u poređenju sa kontrolnom grupom. Takođe je primećeno da je kod životinja tretiranih FNP/DOX-om u dozi od 2 mg/kg došlo do smanjenja nivoa iRNK za katalazu u poređenju sa istom dozom DOX-a, dok je ovakav efekat izostao kod tretmana sa FNP/DOX-om od 4 mg/kg u poređenju sa istom dozom DOX-a (Slika 34).

MnSOD je pokazao drugačiji obrazac ekspresije. Životinje tretirane sa FNP-om su pokazale smanjenje ekspresije iRNK za MnSOD u odnosu na kontrolu. DOX u dozi od

2 mg/kg i FNP/DOX primenjen u dozama od 2 mg/kg i 4 mg/kg su doveli do povećanja ekspresije MnSOD u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe se zapaža da je nivo iRNK za MnSOD bio statistički značajno povećan kod životinja tretiranih sa obe doze FNP/DOX u odnosu na samostalnu primenu DOX-a (Slika 34).



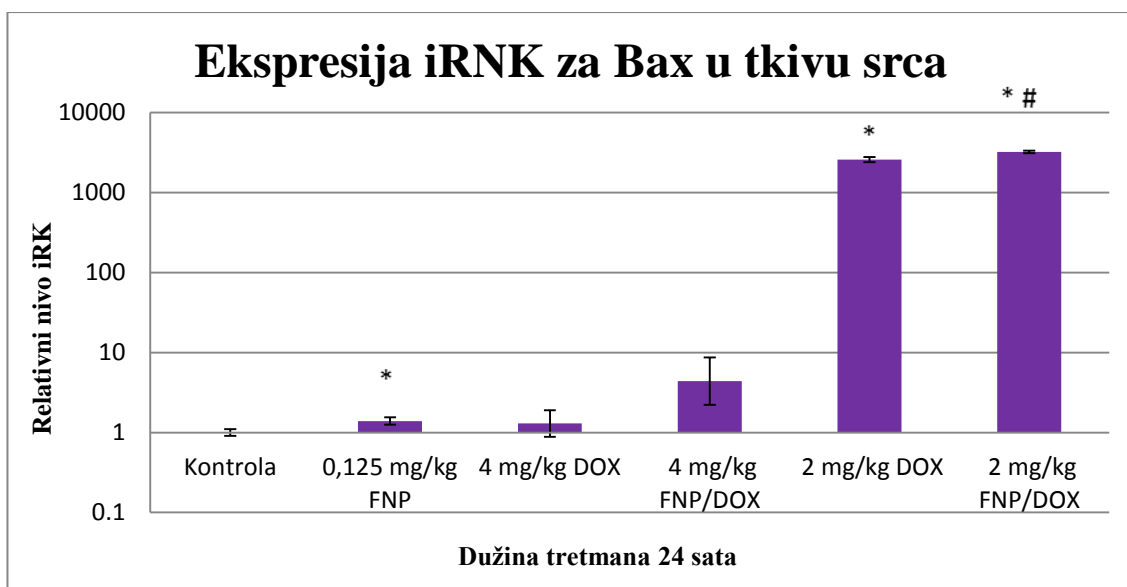
Slika 34. Ekspresije iRNK za katalazu i MnSOD nakon 24 h tretmana FNP-om, DOX-om i FNP/DOX-om u tkivu srca. Rezultati ekspresije iRNK za katalazu i MnSOD su predstavljeni kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu koja je

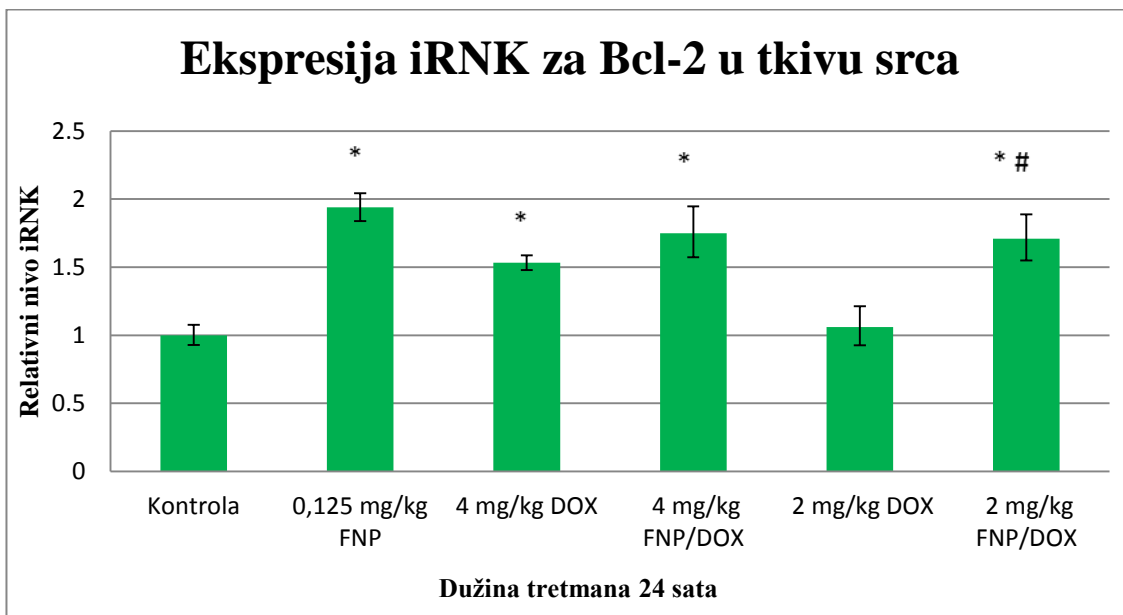
uzeta kao 1. Kao endogena kontrola je upotrebljen GAPDH. Stubići predstavljaju srednju vrednost iz dva ponavljanja \pm SEM. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolu; # $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću dozu DOX-a (Seke i sar., 2016)

4.1.8 DOX i FNP/DOX menjaju ekspresiju Bax i Bcl-2 u srcu pacova

Pored ekspresije iRNK za dva antioksidativna enzima, ispitivani su i efekti DOX-a i FNP/DOX-a na iRNK za Bax, protein koji promovira apoptozu i Bcl-2, protein koji sprečava apoptozu. Rezultati su pokazali tendenciju povećanja nivoa iRNK za Bax u tkivu srca, međutim jedino FNP, DOX i FNP/DOX u manjim dozama od 2 mg/kg pokazuju statistički značajno povećanje ekspresije Bax gena. Takođe rezultati su pokazali da doza od 2 mg/kg FNP/DOX značajno povećava nivo ekspresije iRNK za Bax kada se uporedi sa istom dozom DOX, dok je ovakav efekat izostao kod tretmana FNP/DOX-om od 4 mg/kg u poređenju sa istom dozom DOX-a (Slika 35).

Tretamani životinja FNP-om i DOX-om u dozi od 4 mg/kg i FNP/DOX-om u obe doze su doveli do povećanja nivoa iRNK za Bcl-2, dok DOX u dozi od 2 mg/kg nije remenio ekspresiju iRNK za ovaj gen u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, zapaženo je da doza od 2 mg/kg FNP/DOX-a povećava nivo iRNK za Bcl-2 u poređenju sa istom dozom DOX-a, dok je ovakav efekat izostao kod tretmana FNP/DOX od 4 mg/kg u poređenju sa istom dozom DOX-a (Slika 35).





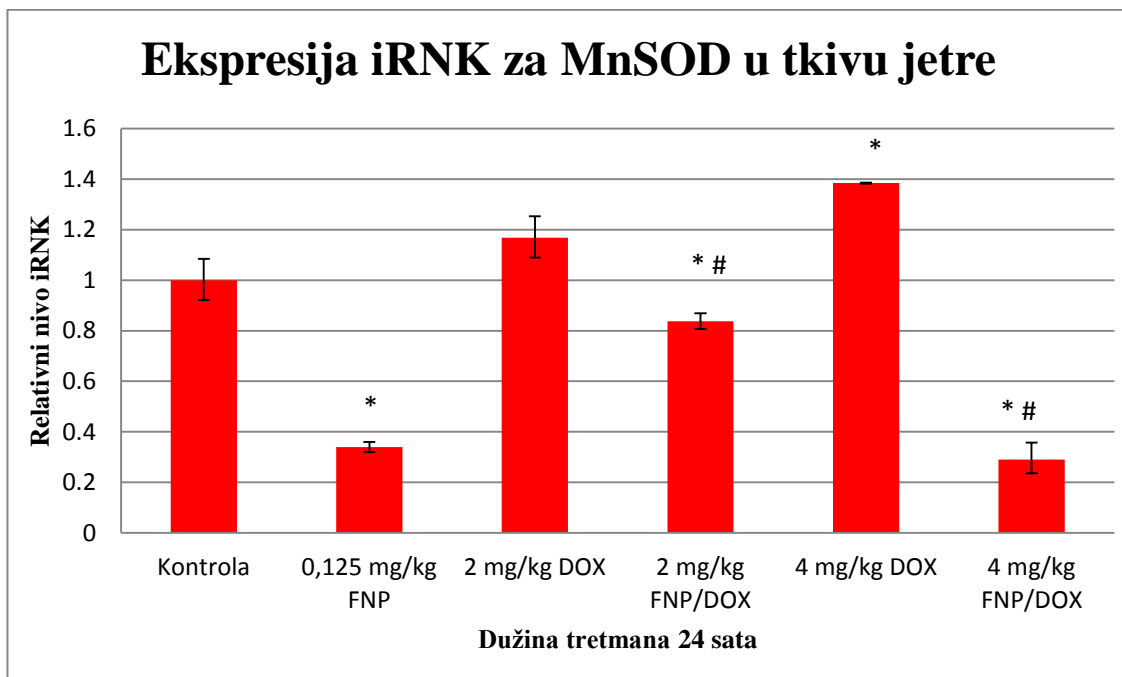
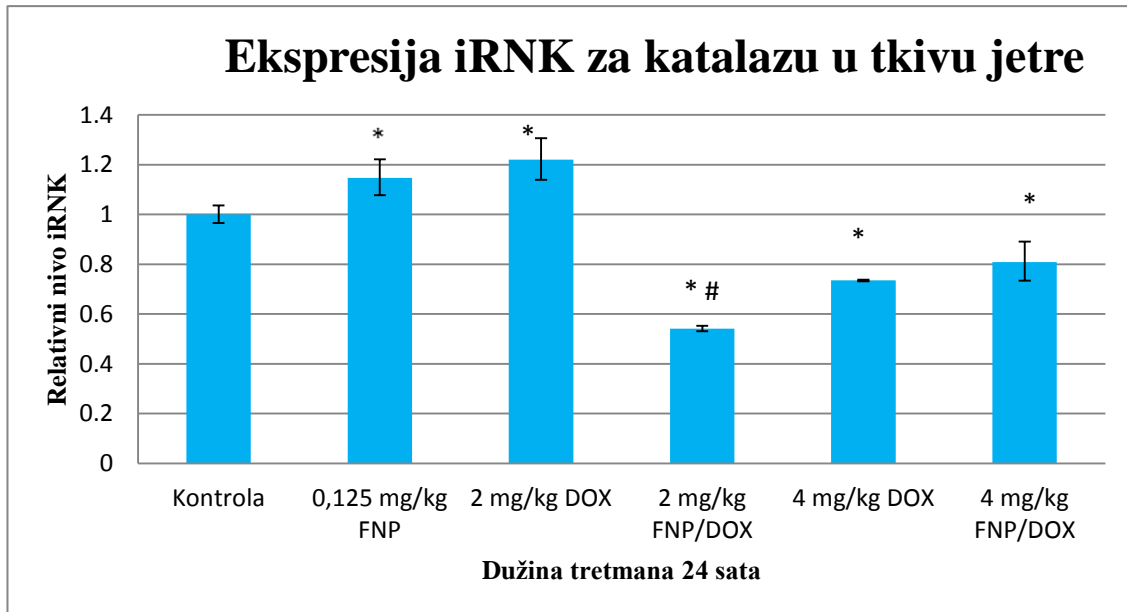
Slika 35. **Ekspresije iRNK za Bax i Bcl-2 nakon 24 h tretmana FNP-om, DOX-om i FNP/DOX-om u tkivu srca.** Rezultati ekspresije iRNK za Bax i Bcl-2 su predstavljeni kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu koja je uzeta kao 1. Kao endogena kontrola je upotrebljen GAPDH. Stubići predstavljaju srednju vrednost iz dva ponavljanja \pm SEM. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolu; # $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću dozu DOX-a (Seke i sar., 2016)

4.1.9 FNP/DOX i DOX menjaju ekspresiju katalaze i MnSOD, u jetri pacova

U ovom istraživanju, praćene su transkripcione promene katalaze i MnSOD u tkivu jetre pacova, nakon 24 h tretmana sa FNP-om, DOX-om i FNP/DOX-om. Rezultati su pokazali da su FNP i DOX u dozi od 2 mg/kg značajno povećava iRNK za katalazu, dok su DOX od 4 mg/kg i FNP/DOX u dozama od 2 mg/kg i 4 mg/kg izazvali smanjenje ekspresije ovog enzima u poređenu sa kontrolnom grupom. Zapaženo je da primena FNP/DOX u dozi od 2 mg/kg značajano smanjuje ekspresiju iRNK za katalazu u poređenju sa samostalnom primenom DOX-a u istoj dozi, dok je ovakav efekat izostao kod tretmana FNP/DOX od 4 mg/kg u poređenju sa istom dozom DOX-a (Slika 36).

Rezultati analize ekspresije MnSOD u jetri su pokazali da FNP i FNP/DOX u obe doze dovode do smanjena, dok primena DOX od 4 mg/kg povećava ekspresiju iRNK za MnSOD u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, zapaža se da tretman FNP/DOX-om u

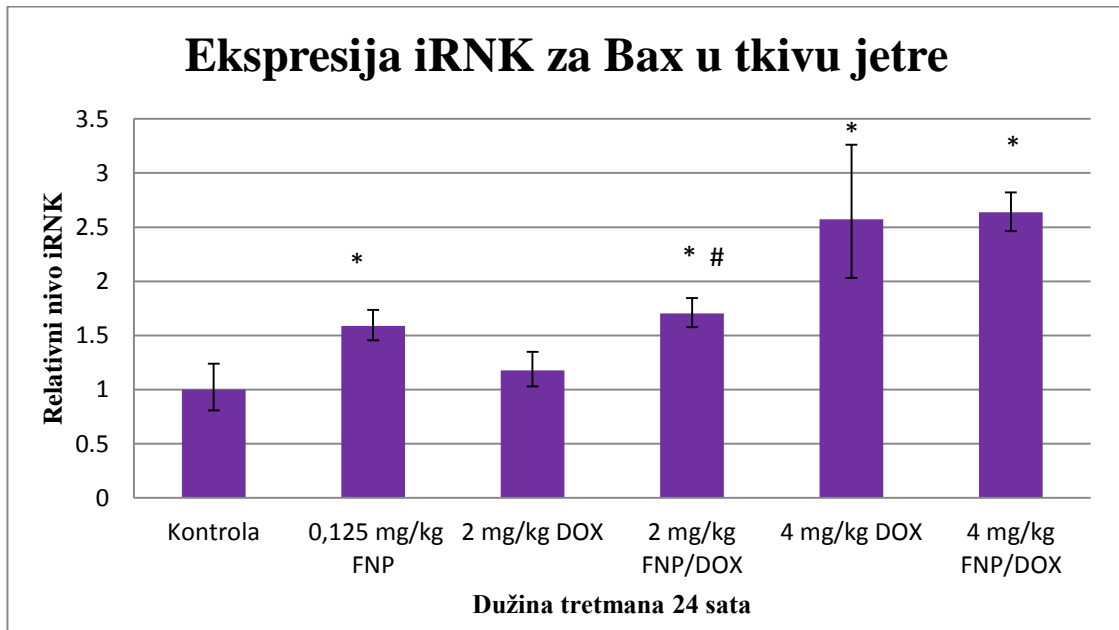
obe doze dovodi do smanja nivoa iRNK za MnSOD u poređenju sa odgovarajućom samostalnom promenom DOX-a (Slika 36).

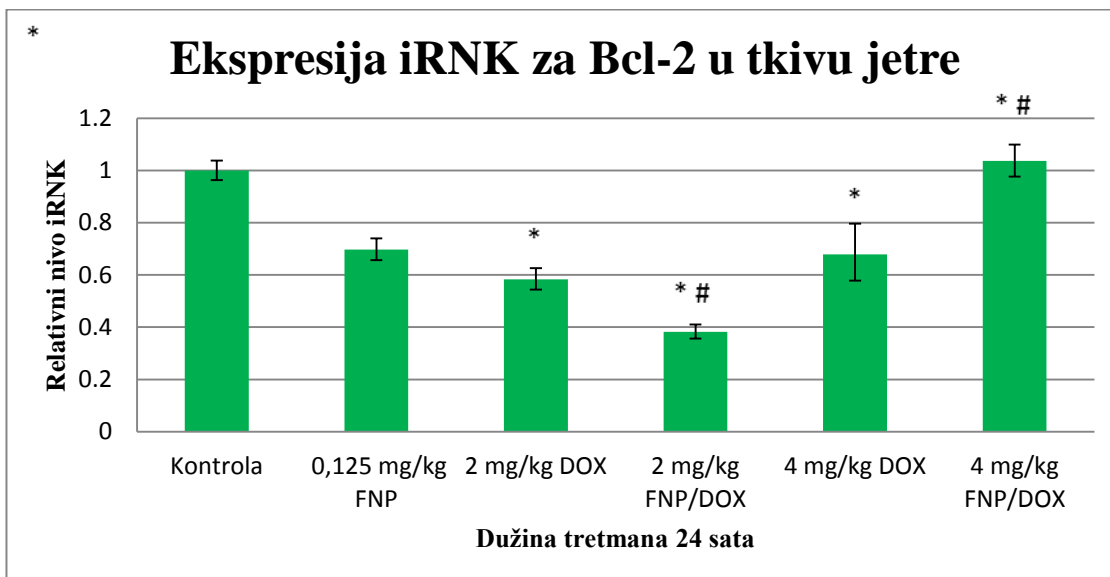


Slika 36. Ekspresije iRNK za katalazu i MnSOD nakon 24 h tretmana FNP-om, DOX-om i FNP/DOX-om u tkivu jetre. Rezultati ekspresije iRNK za katalazu i MnSOD su predstavljani kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu koja je uzeta kao 1. Kao endogena kontrola je upotrebljen GAPDH. Stubići predstavljaju srednju vrednost iz dva ponavljanja \pm SEM. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolu; # $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću dozu DOX-a (Petrovic i sar., 2018)

4.1.10 FNP/DOX i DOX menjaju ekspresiju Bax i Bcl-2, u jetri pacova

Rezultati ispitivanja ekspresije pro i antiapoptotskih gena u tkivu jetre su pokazali da FNP i DOX u dozi od 4 mg/kg i FNP/DOX u obe primenjene doze dovodi do povećane ekspresije Bax gena. Takođe, primećuje se da FNP/DOX od 2 mg/kg povećava iRNK za Bax u odnosu na istu dozu DOX-a (Slika 38). Ekspresija Bcl-2 je bila značajno smanjena nakon tretmana sa FNP-om, sa obe doze DOX i nakon primene FNP/DOX-a od 2 mg/kg, dok je povećanje primećeno kod nakon primene FNP/DOX od 4 mg/kg u odnosu na kontrolnu grupu. FNP/DOX od 2 mg/kg značajno smanjuje ekspresiju Bcl-2 u odnosu na DOX od 2 mg/kg, dok FNP/DOX u dozi od 4 mg/kg povećava ekspresiju ovog gena i odnosu na istu dozu DOX-a (Slika 37).



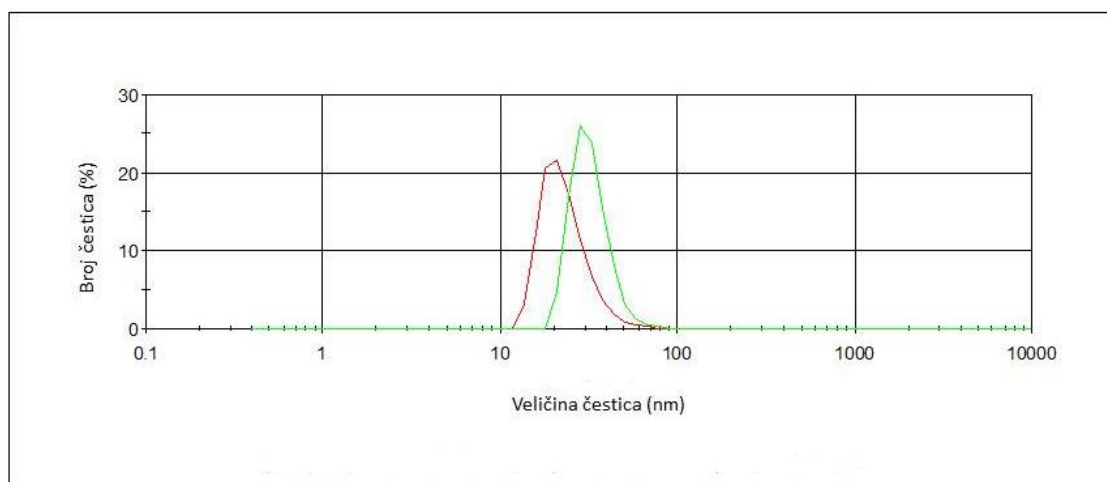


Slika 37. **Ekspresije iRNK za Bax i Bcl-2 nakon 24 h tretmana FNP-om, DOX-om i FNP/DOX-om u tkivu jetre.** Rezultati ekspresije iRNK za Bax i Bcl-2 su predstavljani kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu koja je uzeta kao 1. Kao endogena kontrola je upotrebljen GAPDH. Stubići predstavljaju srednju vrednost iz dva ponavljanja \pm SEM. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolu; # $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću dozu DOX-a (Petrovic i sar., 2018)

4.2 FNP/Fe²⁺ nanokompozit

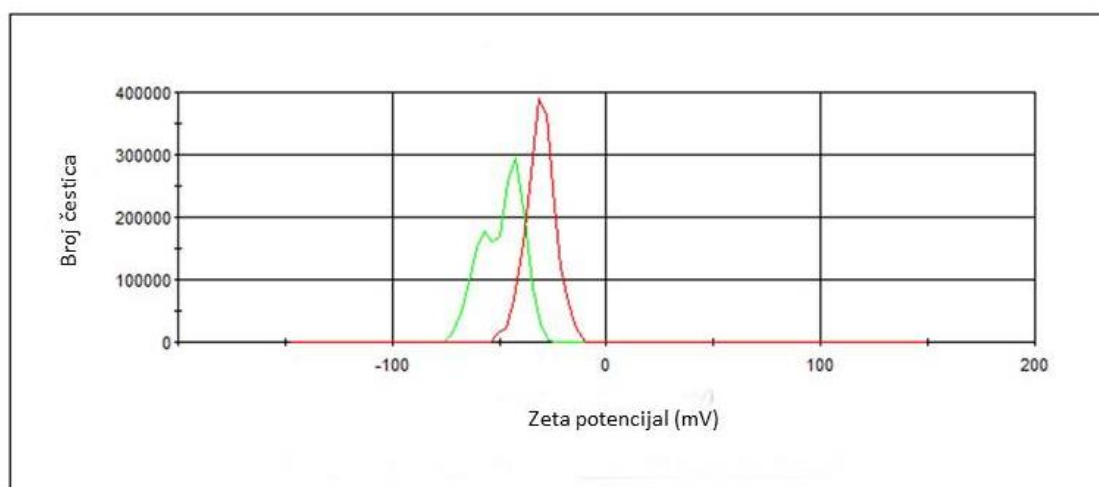
4.2.1 Nanokarakterizacija FNP i nanokompozita FNP/Fe²⁺

Na Slici 38 je prikazana distribucija veličine FNP nanočestica po broju u vodenom rastvoru. Prečnik nanočestica varira u opsegu od 19 - 70 nm pri čemu najveći broj nanočestica (26%) ima dijametar od 28 nm. Na istom dijagramu je prikazana distribucija veličine nanokompozita FNP/Fe²⁺ u opsegu od 11 – 60 nm, pri čemu su nanočestice od 21 nm najprisutnije (21,7%). Podaci su dobijeni metodom baziranoj na dinamičkom rasejanju svetlosti.



Slika 38. Distribucija veličine čestica FNP-a (zeleno linija) i FNP/Fe²⁺ (crvena linija) po broju u vodenom rastvoru pri pH=6, nakon 48 h inkubacije u mraku na 22 °C (Seke i sar., 2019)

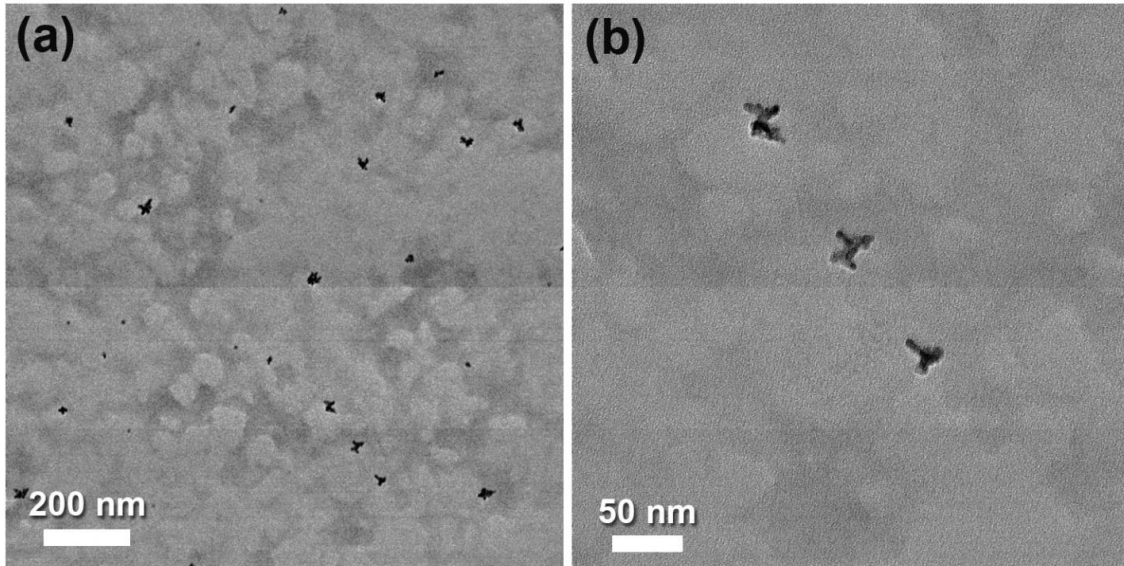
Merenja zeta potencijala su pokazala da FNP u vodenom rastvoru poseduje neelektrisanje od -49.2 mV, dok vrednost za FNP/Fe²⁺ iznosi -30.8 mV (Slika 39).



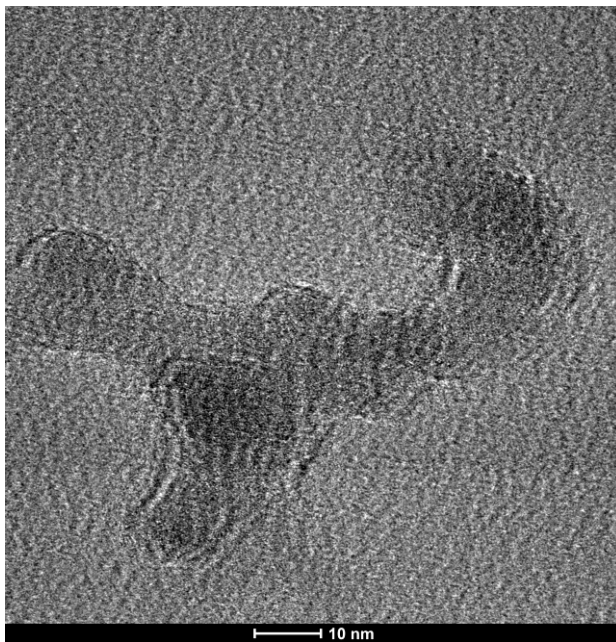
Slika 39. Zeta-potencijal FNP-a (zeleno linija) i FNP/Fe²⁺ (crvena linija) u vodenom rastvoru pri pH=6 nakon 48 h inkubacije u mraku na 22 °C (Seke i sar., 2019)

TEM analiza nanokompozita FNP/Fe²⁺ u vodi, nakon 48 h inkubacije u mraku, na 22 °C, je prikazana na Slici 40a. Na slici je uočljiva nehomogenost uzorka koja se reflektuje kako u prisustvu nepravilnih oblika čestica tako i u prisustvu različitih veličina čestica između 10 nm i 50 nm. Aglomeracija čestica veličine nekoliko

nanometara, kao proizvod daje nejednake veće forme (Slika 40b). TEM analiza uzorka FNP otkriva nanočestice veličine oko 20 nm (Slika 40c).

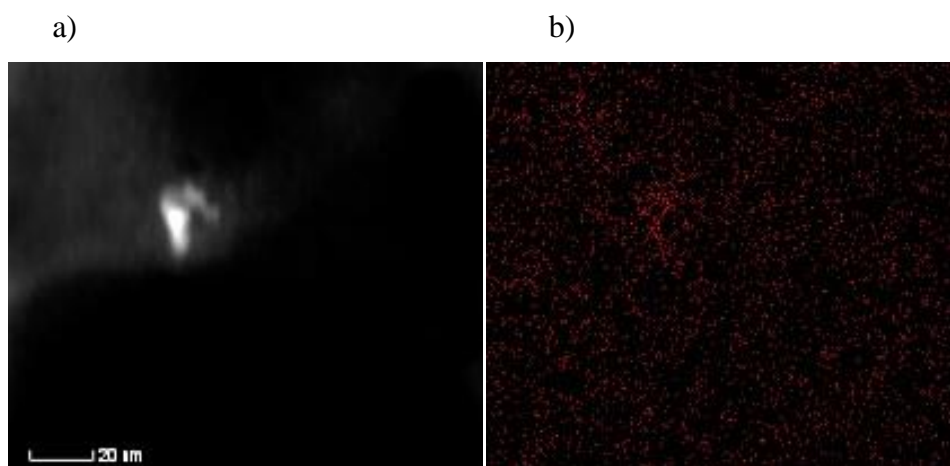


(c)



Slika 40. TEM mikrografija nanokompozita FNP/Fe²⁺, manje uveličanje (a) i veće uveličanje (b); FNP, veliko uveličanje (c) (Seke i sar., 2019)

TEM-EDS analiza nanokompozita FNP/Fe²⁺ je pokazala povećano prisustvo Fe²⁺ unutar agregata u poređenju sa okolinom implicirajući da je došlo do vezivanja jona gvožđa za FNP (Slika 41).



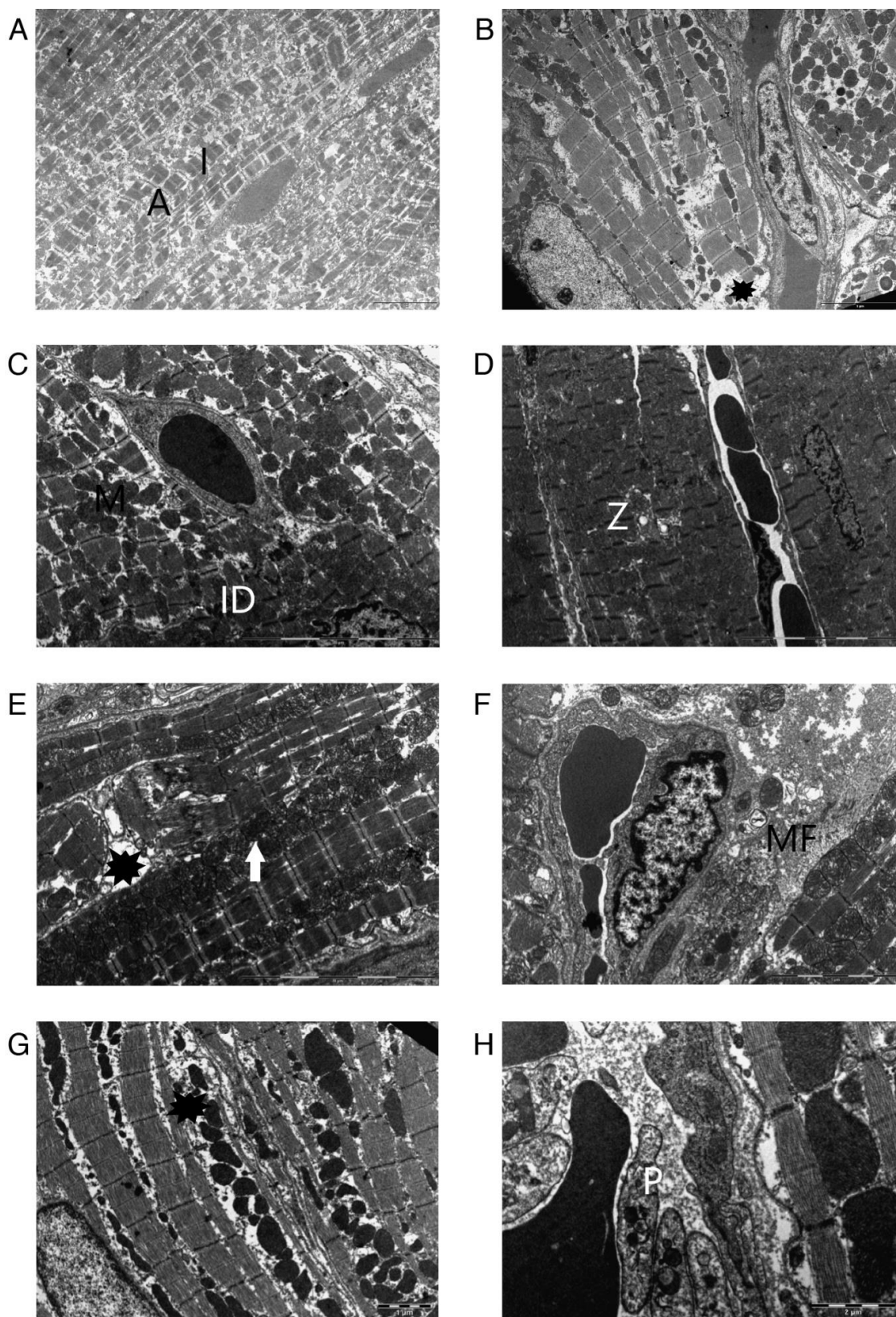
Slika 41. TEM-EDS mikrofografija agregata nanokompozita FNP/Fe²⁺, (a) spektralna analiza, (b) mapiranje elementarnog gvožđa (Seke i sar., 2019)

4.2.2 FNP/Fe²⁺ u predtretmanu sa DOX-om menja ultrastrukturne karakteristike tkiva srca i jetre

S ciljem da se utvrdi da li predtretman nanokompozita FNP/Fe²⁺ utiče i na ultrastrukturne promene tkiva srca i jetre pacova, izvršena je analiza tkiva transmissionom elektronskom mikroskopijom 24 h nakon tretmana životinja, kada su bili primenjeni FNP, DOX, nanokompozit FNP/Fe²⁺ i predtretman FNP/Fe²⁺ 1 h pre primene DOX-a.

U tkivu srca kontrolne grupe se uočavaju intaktne mitohondrije, regularno aranžirani miofibrili sa dobro struktuiranim kros-stricijama i odvojenim A i I trakama (Slika 42A). Kod pacova tretiranih sa 0,125 mg/kg FNP, primećene su sledeće promene u tkivu srca: intracelularni edem između miofibrila koji prouzrokuje njihovo razdvajanje; kardiomiociti su vakuolirani usled poremećene strukture cisterni endoplazmatičnog retikuluma, mitohondrije su regularno aranžirane ali sa prisutnim defektima kao što su oštećene kriste i prisutne rupture na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani. Dodatno je

primećeno fokalno cepanje miofibrila kao i remećenje strukture interkalatnih diskova. Primećeno je i prisustvo edematoznih endotelih ćelija, u intersticijalnom tkivu, kod kojih je prisutan fenomen kariolize (Slika 42B). Morfologija tkiva srca, u grupi tretiranoj sa 0,06 mg/kg FNP/Fe²⁺, generalno je očuvana. Sporadično su primećeni intracelularni edem, vakuolizacija i odvajanje sarkoleme od miofibrila. Struktura intrakalatnih diskova je regularna ali su Z trake sa prisutnom elektronskom gustinom. U pojedinim delovima uzorka se može uočiti apoptoza intersticijalnih fibroblasta i endotelijalnih ćelija endomizijuma. U pojedinim fibroblastima je uočena autofagija. Primećeno je da je unutrašnja membrana mitohondrijalnih krista oštećena i da su prisutne dilatacije sarkoplazmatskog retikuluma (Slika 42C,D). Tkivo srca kod pacova tretiranih sa DOX-om u dozi od 4 mg/kg je pretrpelo brojne promene. Usled dilatacije mitohondrija i cisterni sarkoplazmatskog retikuluma, došlo je do intenzivne dilatacije sarkoplazme. Uočeno je prisustvo megamitohondrija koje nastaju kao posledica fuzija mitohondrija regularne veličine. Kompromitovan je i integritet sarkoleme. Plazma membrana je sa oštećenjima i odvojenim miofibrilima. Prisutna je hiperkontraktacija sarkomera kao i oštećene veze interkalatnih diskova. Oštećena sarkolema dopušta pasivnu migraciju eritrocita ispod ćelijske membrane kardiomiocita pri čemu se javlja fenomen sličan emperiopolezi. Uočena je i ekstravazacija eritrocita sa intersticijalnom hemoragijom. Morfologija mikrokrvnih sudova u intersticijalnom tkivu je očuvana, mada je primećena apoptoza u pojedinim endotelnim ćelijama i intersticijalnim fibroblastima. Ultrastrukturna analiza je otkrila slične promene i u tkivu jetre. Mitohondrije su iregularne veličine sa elekron-gustim matriksom. Prisutna je i apoptoza hepatocita. Mijelinske figure i mikrovezikularne masne promene su takođe primećene (Slika 42E, F). U grupi tretiranoj sa 0.06 mg/kg FNP/Fe²⁺ 1 h pre primene DOX-a, morfologija kardiomiocita je očuvana kao i struktura interkalatnih diskova. U pojedinim kardiomiocitima primećena su oštećenja na unutrašnjim mitohondrijalnim membranama kao i dilatacije sarkoplazmatskog retikuluma. Uočene su i marginalizacije hromatina i apoptoza endotelih ćelija. U ekstracelularnom prostoru je vidljiva ekstravazacija eritrocita, dok je na zidovima kapilara ustanovljena adhezija i agregacija (Slika 42G, H).



Slika 42. Elektronske mikrofografije tkiva srca pacova tretiranih različitim jednokratnim *i.p.* tretmanima. A) kontrolna grupa, 0,9% NaCl, intaktne mitohondrije, regularno aranžirani miofibrili sa dobro strukturiranim kros-striacijama i

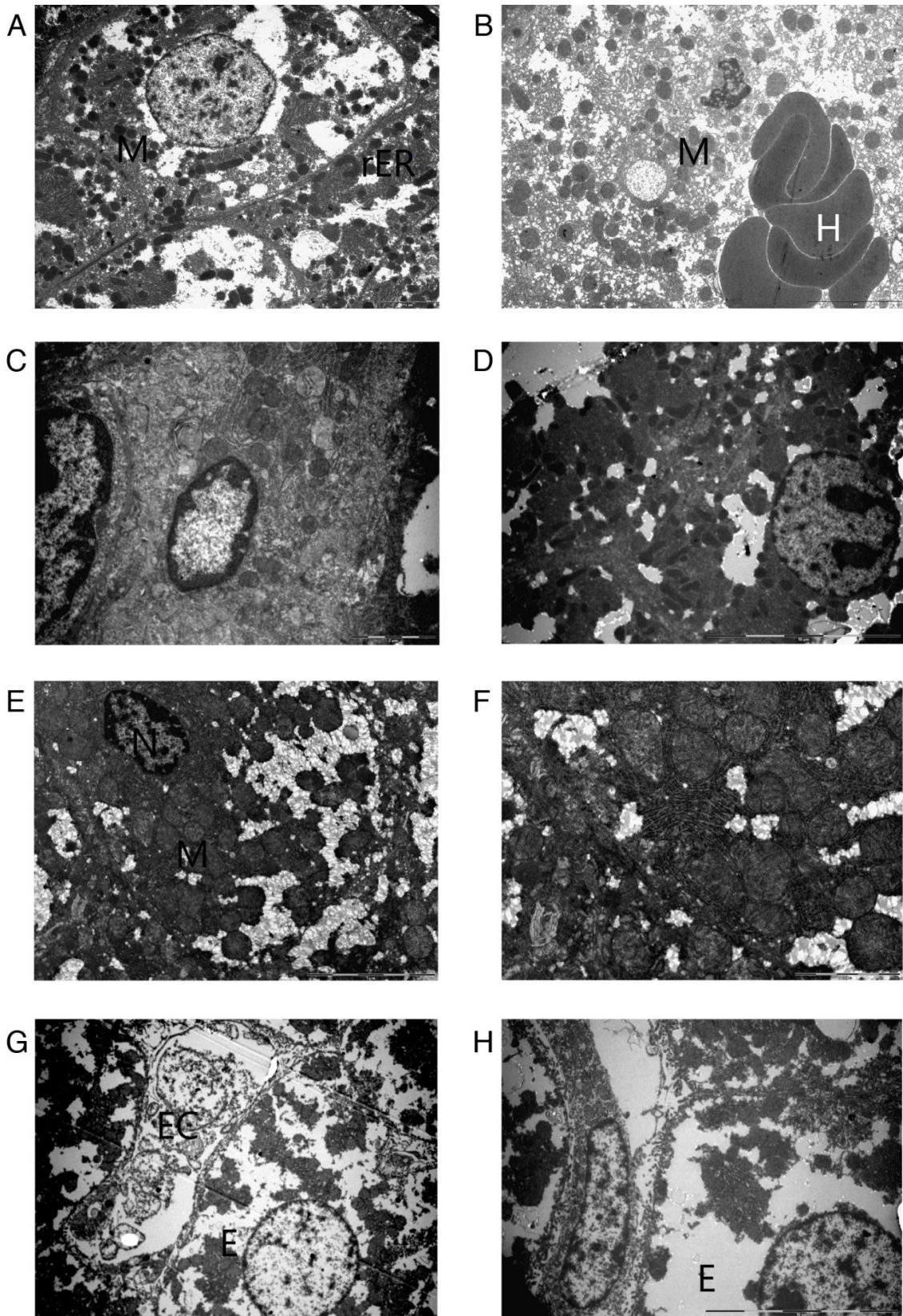
odvojenim A (A) i I trakama (I); B) 0.125 mg/kg FNP grupa, intracelularni edem između fibrila koji prouzrokuje odvajanje (zvezda), regularno aranžirane mitohondrije sa oštećenim kristama i rupturama na spoljnoj membrani, cepanje miofibrila i remećenje strukture interkalatnih diskova, edematozne endotelne ćelije sa fenomenom kariolize; C) i D) - 0.06 mg/kg FNP/Fe²⁺ grupa, intersticijalni edem, odvajanje sarkoleme od miofibrila, oštećenje interkalatnih diskova (ID), očuvano tkivo srca, vakuolizacija, apoptoza endotelnih ćelija, Z-linije povećane elektronske gustine (Z); E) i F) - 4 mg/kg DOX-ska grupa, cepanje interkalatnih diskova (zvezda), mitohondrije sa neregularnim cirkularnim kristama, dilatacija krista i elektronski gust matriks (strelica), mijelinske figure (MF), fokalno edematozne mitohondrije sa svetlim matriksom i dilatirane kriste, megamitohondrije nastale usled fuzije; G) i H) - 0.06 mg/kg FNP/Fe²⁺ 1 h pre 4 mg/kg DOX-ska grupa, očuvane ćelijske strukture, intaktne mitohondrije, adhezija i agregacija platela za endotelijum (P). A) 3000x; bar=5 µm, B) 3800x; bar=5 µm, C) 4400x; bar=10 µm, D) 3500x; bar=10 µm, E) 4400x; bar=10 µm, F) 5600x; bar=5 µm, G) 5600x; bar=1 µm, H) 14000x; bar=2 µm (Seke i sar., 2019)

4.2.3 FNP/Fe²⁺ u predtretmanu sa DOX-om menja ultrastrukturne karakteristike tkiva jetre

Morfologija jetre kontrolne grupe pacova je prikazana na Slici 43A. Ćelije jetre kontrolne grupe pokazuju regularnu morfologiju, sa intaktnim ćelijskim strukturama.

Analiza morfologije tkiva jetre kod životinja tretiranih sa 0,125 mg/kg FNP je pokazala da je došlo do promena fokalnog karaktera. U hepatocitima su uočene mijelinske figure, mikrovezikularne masne promene i autofagija vakuola. Kod mitohondrija je ustanovljeno da su prisutne u različitim veličinama kao i da imaju povećanu elektronsku gustinu. Uočena je i pojava apoptoze kod intersticijalnih ćelija kao i prisustvo intersticijalne hemoragije. Javlja se i fenomen emperiopoleze kod koga se eritrociti podvlače pod citoplazmu hepatocita (Slika 43B). Tkivo jetre u grupi tretiranoj sa FNP/Fe²⁺ je generalno očuvane morfologije. Intracelularni edem je primećen sporadično kod hepatocita, dok je u intersticijalnom tkivu, primećena sporadična apoptoza endotelijalnih ćelija (Slika 43C, D). U tkivu jetre kod životinja tretiranih sa DOX detektovan fenomen sličan emperiopolezi sa difuznim oštećenjima kapilara. Ustanovljena je apoptoza endotelnih ćelija zajedno sa intersticijalnom hemoragijom (Slika 43E, F). U eksperimentalnoj grupi koja je primila FNP/Fe²⁺ 1 h pre DOX-a utvrđeno je prisustvo intra i ekstracelularnog edema u jetri. Prisutna su i oštećenja većih krvnih sudova koja su praćena ekstravazacijom eritrocita. Apoptoza endotelnih ćelija i

glatkih mišićnih ćelija je takođe primećena. U ovoj grupi životinja uočena je i jedna osobenost koja se odnosi na depoziciju fibrila kolagena u intersticijumu (Slika 43G, H). Ono što ovde posebno treba istaći, jeste da su sve promene fokalnog karaktera.



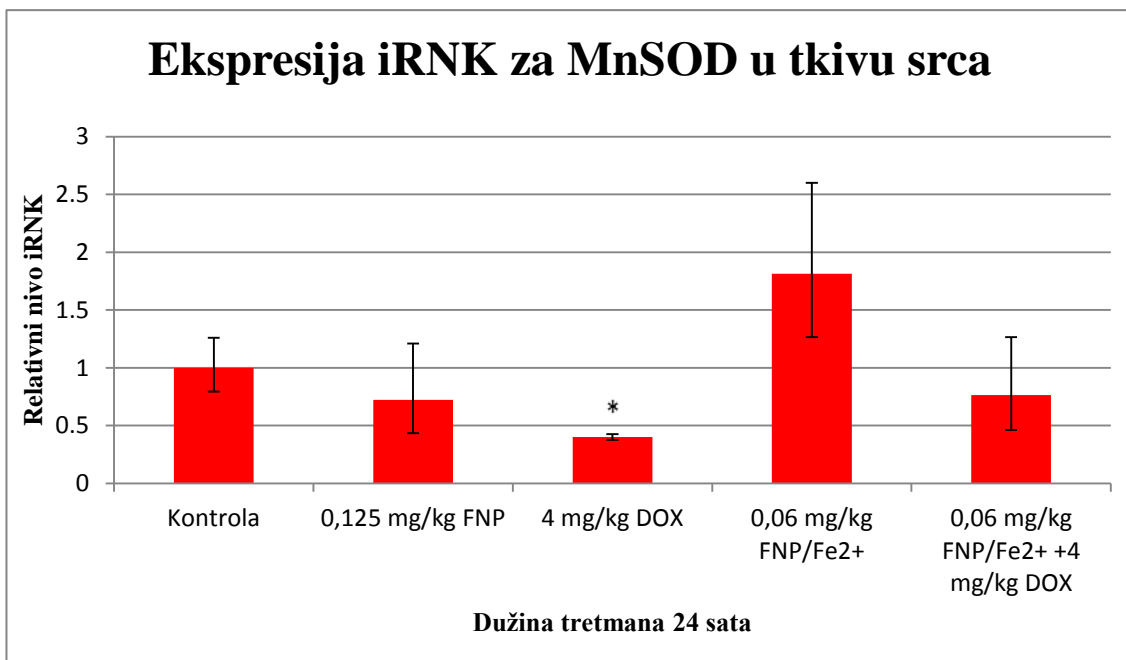
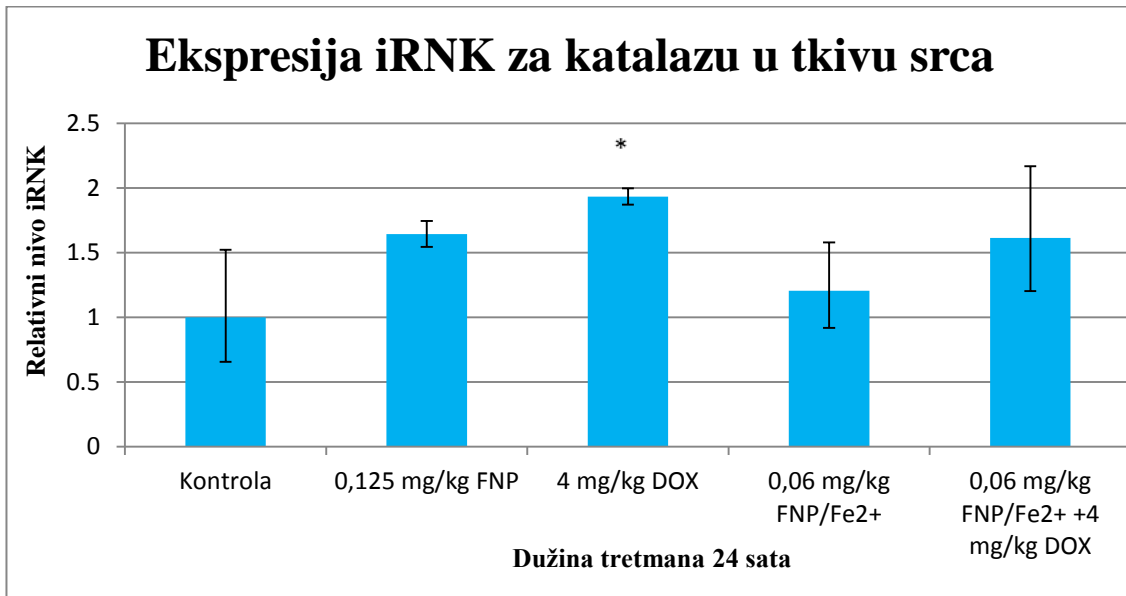
Slika 43. Elektronske mikrografije tkiva jetre pacova tretiranih različitim jednokratnim *i.p.* tretmanima. A) - kontrolna grupa, 0.9% NaCl, hepatociti sa izraženim jedrima (N), brojne mitohondrije (M), široko prisutan granulirani

endoplazmatični retikulum (rER); B) - 0.125 mg/kg FNP grupa, povećana elektronska gustina i varijacije u veličini mitohondrija (M), intersticijalna hemoragija (H); C) i D) - 0.06 mg/kg FNP/Fe²⁺ grupa, intracelularni edem, apoptoza endotelih ćelija; E) i F) - 4 mg/kg DOX-ska grupa kondenzacija hromatina (N) sa apoptozom hepatocita, mitohondrije sa electron-gustim matriksom i oštećene kriste (M); G) i H) - 0.06 mg/kg FNP/Fe²⁺ 1 h pre 4 mg/kg DOX-a, intra (E) i ekstracelularni edem, oštećeni krvni sudovi (EC) zajedno sa ekstravazacijom eritrocita, apoptoza endotelih i glatkih mišićnih ćelija, depozicije fibrila kolagena u intersticijumu. A) 2650x; bar=5 µm, B) 4400x; bar=5 µm, C) 8900x; bar=7 µm, i D) i H) 4400x; bar=10 µm, E) 5600x; bar=5 µm, F) 11000x; bar=5 µm, G) 2800x; bar=10 µm (Seke i sar., 2019)

4.2.4 Predtretman nanokompozitom FNP/Fe²⁺ ne utiče na promenu ekspresije katalaze i MnSOD u tkivu srca kod životinja tretiranih DOX-om

S ciljem da se utvrdi da li predtretaman FNP/Fe²⁺ utiče na promene u ekspresiji katalaze i MnSOD u srcu i jetri, tokom tremana DOX-om, kvantifikovana je iRNK za ova dva enzima. U ovim eksperimetnima korišćen je DOX u dozi od 4 mg/kg jer je pokazano da ova doza remeti ekspresiju katalaze i MnSOD u srcu i jetri pacova.

Rezultati su pokazali da, u tkivu srca, jedino DOX u dozi od 4 mg/kg povećava nivo iRNK za katalazu, dok u ostalim eksperimentalnim grupama nije došlo do značajnijih promena u expresiji ovog gena kako u poređenju sa kontrolnom grupom, tako i u poređenju sa DOX-skom grupom (Slika 44). Ekspresija MnSOD u tkiva srca je bila značajno smanjena jedino nakon tretmana životinja sa DOX-om od 4 mg/kg, dok ostale grupe nisu remetile nivo iRNK za ovaj enzim kako u poređenju sa kontrolnom grupom, tako i u poređenju sa DOX-skom grupom (Slika 44).

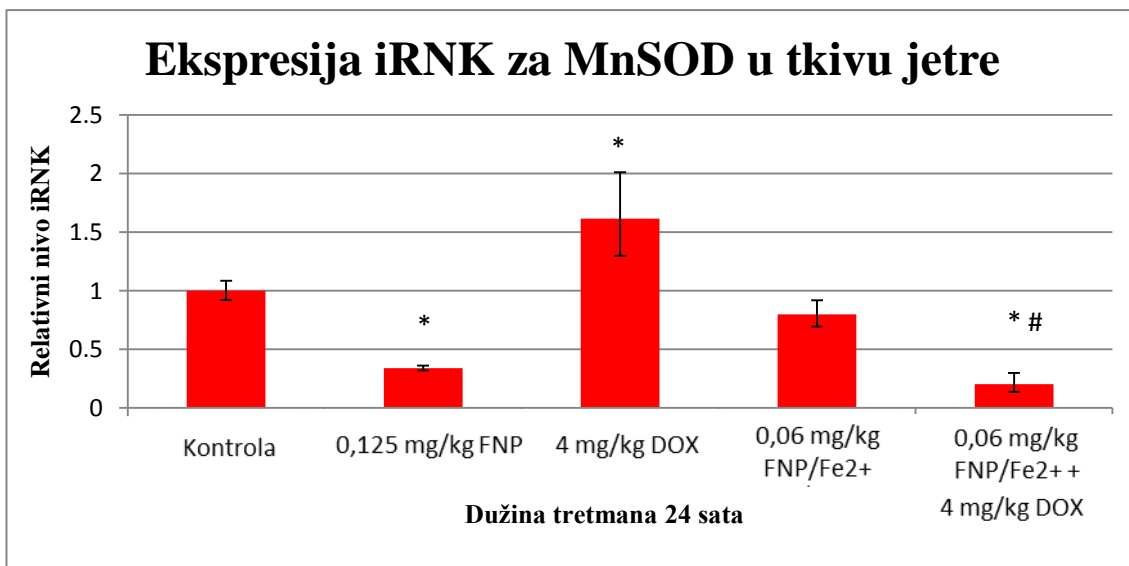
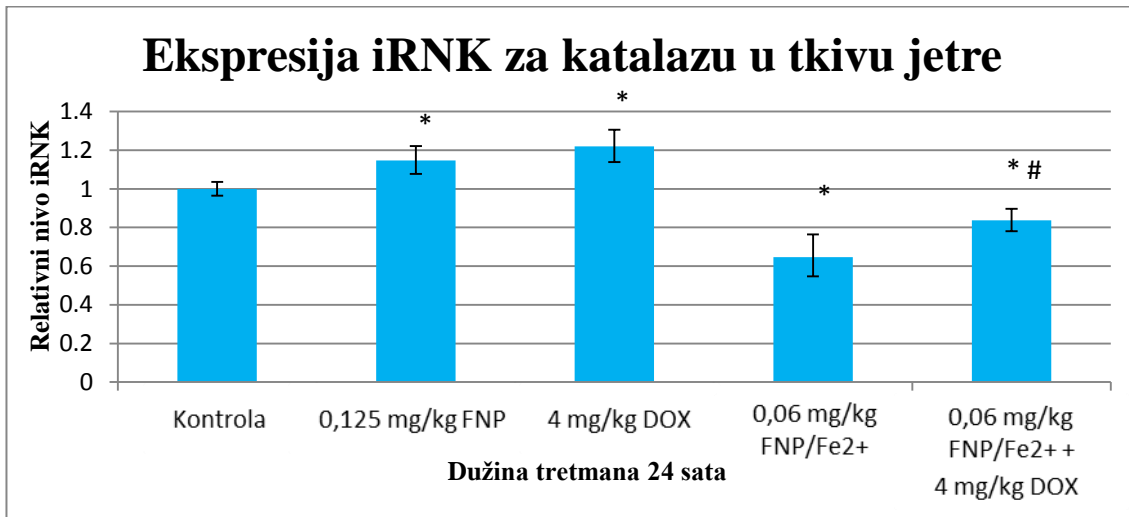


Slika 44. Ekspresije iRNK za katalazu i MnSOD nakon 24 h tretmana FNP-om, DOX-om i FNP/Fe²⁺-om u tkivu srca. Rezultati ekspresije iRNK za katalazu i MnSOD su predstavljani kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu koja je uzeta kao 1. Kao endogena kontrola je upotrebljen GAPDH. Stubići predstavljaju srednju vrednost iz dva ponavljanja ± SEM. *p<0.05 u odnosu na kontrolu; # p< 0.05 u odnosu na odgovarajuću dozu DOX-a (Seke i sar., 2019).

4.2.5 Predtretman FNP/Fe²⁺ sprečava DOX-om izazvano povećanje ekspresije katalaze i MnSOD u jetri pacova

U jetri pacova, DOX i FNP su doveli do povećanja iRNK za katalazu, dok su samostalni tretmani od 0,06 mg/kg FNP/Fe²⁺ i pretretman od 0,06 mg/kg FNP/Fe²⁺ 1 h pre DOX-a, doveli do smanjenja iRNK za katalazu u poređenju sa kontrolnom grupom. Takođe, zapaža se da je pretretman od 0,06 mg/kg FNP/Fe²⁺ 1 h pre DOX-a doveo do smanjenja iRNK za katalazu u odnosu na grupu tretiranu samo sa DOX-om (Slika 45).

Sa druge strane, nivoi ekspresije iRNK za MnSOD u jetri pacova su pokazali očekivani ekspresioni obrazac. Rezultati su pokazali da je primena DOX-a indukuje ekspresiju MnSOD u odnosu na kontrolnu grupu. U grupi tretiranoj sa FNP, kao i u grupi koja je tretirana sa 0,06 mg/kg FNP/Fe²⁺ 1 h pre DOX-a, došlo je do značajnog smanjenja ekspresije iRNK za ovaj enzim u odnosu na kontrolnu grupu. Slično kao i kod katalaze, zapaža se da je ekspresija iRNK za MnSOD, kod životinja koji su bile pretretirane sa 0,06 mg/kg FNP/Fe²⁺ 1 h pre primene DOX-a, smanjena u poređenju sa grupom koja je primila samo DOX (Slika 45).



Slika 45. Ekspresije iRNK za katalazu i MnSOD nakon 24 h tretmana FNP-om, DOX-om i FNP/Fe²⁺-om u tkivu jetre. Rezultati ekspresije iRNK za katalazu i MnSOD su predstavljeni kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu koja je uzeta kao 1. Kao endogena kontrola je upotrebljen GAPDH. Stubići predstavljaju srednju vrednost iz dva ponavljanja ± SEM. *p<0.05 u odnosu na kontrolu; # p< 0.05 u odnosu na odgovarajuću dozu DOX-a (Seke i sar., 2019)

5. DISKUSIJA

Derivatizovani karbonski nanomaterijali, uključujući fullerene, nanocevi i grafene, ne poseduju samo jedinstvene strukturne i elektronske osobine, već i značajan potencijal u „zarobljavanju” slobodnih radikala što ih svrstava u kategoriju antioksidanata. Njihova interakcija sa antitumorskim lekovima kao što je DOX može pomoći u balansiranju negativnih štetnih efekata hemioterapeutika, a takođe unaprediti dostavu lekova iskorišćavajući prednost pojačanog ćelijskog unosa, selektivnost na tumorske ćelije kao i regulisano otpuštanje u zavisnosti od pH sredine (Blazkova i sar., 2014; Jović i sar., 2016; Seke i sar., 2016). U ovoj tezi su iskorišćene fizičko-hemijske osobine nanočestica fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$, kao pogodnog nosača za DOX i Fe^{2+} u sintezi dva različita nanokompozita FNP/DOX i FNP/ Fe^{2+} .

Teza obuhvata dve osnovne celine: nanokarakterizaciju nanokompozita FNP/DOX i FNP/ Fe^{2+} selektovanim fizičko-hemijskim metodama i ispitivanje njihovog uticaja na različitim biološkim modelima, molekularno-biološkim i histološkim metodama, sa uporednom analizom nanokompozita i samostalno aplikovanog komercijalnog leka DOX-a.

Fizičko-hemijskom karakterizacijom su utvrđeni veličina, naelektrisanje, morfologija i stabilnost nanokompozita. Fizičko-hemijske osobine nanočestica su esencijalne za njihovu sigurnu i efikasnu terapijsku primenu (Zhang i sar., 2008). Veličina nosača lekova u velikoj meri utiče na njihovu bioaktivnost i biodostupnost. Čestice veće od 300 nm aktiviraju sistem komplementa koji omogućava eliminaciju čestica iz organizma (Dobrovolskaia i sar., 2008); čestice veće od 100 nm se većinom odstranjuju putem mononuklearnog fagocitnog sistema, dok čestice manje od 6 nm podležu klirensu putem bubrega. S obzirom da se čestice veličine između 6-100 nm eliminišu sporijim putem preko jetre i žuči (Zhang i sar., 2016), za pripremu nanokompozita FNP/DOX i FNP/ Fe^{2+} korišćene su čestice FNP-a malih dimenzija (17 - 42 nm). Izmerena veličina FNP čestica je u skladu sa rezultatima Assemi i saradnika (Assemi i sar., 2010). Dekoracija DOX u nanokompozitu FNP/DOX nije dovela do značajnije promene veličine nanočestica FNP (Slike 8, 9, 13, 14, 15 i 16). Opseg veličina

sintetisanih nanočestica povećava šansu za bolji antitumorski efekat. Sa jedne strane izbegava se brži klirens nanočestica čime se obezbeđuje dovoljno vremena za dopremanje do ciljnih organa tokom terapijskog tretmana. Sa druge strane, kao što je istraživanje Cabral i saradnika pokazalo, manje nanočestice, od oko 30 nm, lakše penetrišu u slabo propustljive tumore povećavajući antitumorski efekat, za razliku od većih nanočestica (Cabral i sar., 2011). Veličina nanočestica utiče i na signalne procese neophodne za osnovno funkcionisanje ćelija, pri čemu nanočestice radijusa između 40 - 50 nm ostvaruju najveći efekat (Jiang i sar., 2008).

Istraživanjem zeta-potencijala je ustanovljeno da FNP i DOX međusobno interaguju stabilnim elektrostatičkim vezama s obzirom da novoformirani nanokompozit FNP/DOX ima viši zeta-potencijal (-8 mV) u poređenju sa zeta-potencijalom samog FNP (-28 mV) (Slike 10 i 11). Analizom masenog spektra dobijenog UPLC (eng. *Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tunable UV Detector/Time-of-flight mass spectrometry*) hromatografijom sa masenom detekcijom dodatno je potvrđeno da u nanokompozitu FNP/DOX ne dolazi do kovalentnog vezivanja između FNP i DOX (Seke i sar., 2016). Potvrda, da su fulerenolske nanočestice efikasni nosioci DOX-a, dolazi i iz istraživanja Tang i saradnika koji su ispitivali hibridne nanočestice formirane od DOX-a i C₆₀(OH)₂₂ koji nekovalentno interaguju i zatim su inkapsulirani u polimerne micelle (Tang i sar., 2018). Tom prilikom je C₆₀(OH)₂₂ omogućio da se efikasnost inkapsuliranja DOX-a u micelu poveća sa 5% na 79%. Značaj naelektrisanja nanočestica se ogleda u rezultatima eksperimenata koji su utvrdili da nanočestice veličine između 50–100 nm koje su ujedno blago negativno naelektrisane, lakše penetrišu u velike tumore, nakon njihove sistemske primene (Chen 2010).

Unos nanočestica od strane ćelija može biti izmenjen usled razlika u elektrostatičkim interakcijama između čestice i ćelijske membrane i adsorpcije proteina na površini nanočestica (Yang i sar., 2015). U zavisnosti od vrste receptora prisutnih na površini ćelija zavisiće i efikasnost unosa kako pozitivno naelektrisanih tako i negativno naelektrisanih nanočestica (Poelstra i sar., 2012; Wang i sar., 2015). Površinsko naelektrisanje takođe dovodi do različite adsorpcije lipoproteina na nanočestice utičući na puteve eliminacije i kinetiku (Kumar i sar., 2010). Cheng i saradnici su utvrdili da su

apolipoprotein E i imunoglobulin A, vezani za površinu pozitivno naelektrisanih nanočestica, odgovorni za njihovu akumulaciju unutar hepatocita (Cheng i sar., 2012). Istraživanja ukazuju da je kinetika eliminacije pozitivnih čestica iz organizma brža. Naime, Souris i saradnici su ustanovili da mezoporozne nanočestice, sa pozitivnim zeta-potencijalom podležu hepatobilijarnom klirensu već 30 min nakon administracije, dok su Ye i saradnici opisali da negativno naelektrisane zlatne nanocevi bivaju eliminisane tek nakon 72 h (Souris i sar., 2010; Ye i sar., 2015). Uzimajući u obzir da je zeta-potencijal blago negativan kod nanokompozita FNP/DOX, moguće je da pored veličine same nanočestice i njeno naelektrisanje utiče na sporiji klirens iz organizma.

Što se tiče stabilnosti nanokompozita FNP/DOX, rezultati ukazuju da se tokom vremena nanočestice ne raspadaju na manje niti agregiraju u značajnije veće forme, već zadržavaju distribuciju veličine u nanometarskom opsegu (Slika 12). Ova osobina nanočestica je od značaja u praksi jer omogućava njihovo korišćenje duži vremenski period. Analiza površinske topologije i morfologije čestica pokazuje da nanokompozit FNP/DOX poseduje veliku diskoidalnu površinu (njihov prečnik je oko deset puta veći od visine, Slike 13 i 14) koja mu pruža veći broj kontaktnih tačaka, za razliku od sferičnih nanočestica. Nanočestice diskoidalne geometrije su podložnije prevrtanju i oscilatornom kretanju u krvotoku, čime im se povećava afinitet ka endotelnim ćelijama i potencijal ekstravazacije kroz fenestracije krvnih sudova (Blanco i sar., 2015). S obzirom da interakcija nanočestica sa ćelijama zavisi od više faktora: veličine, oblika, naelektrisanja, osobina materijala, ove interakcije do danas nisu u potpunosti razjašnjene (Chithrani i sar., 2007; Jiang i sar., 2008; Fubini i sar., 2010).

Imajući u vidu neophodnost gvožđa u ćelijskom metabolizmu, a posebno njegovo učešće u mitohondrijama i elektrotransportnom lancu (Camaschella i sar., 2020), kao i interakciju gvožđa sa DOX-om pri čemu nastaje kompleks koji dovodi do lipidne peroksidacije (Samuni i sar., 1986), u ovoj tezi, je efikasno sintetisan i nanokompozit FNP/Fe²⁺ i izvršena je njegova fizičko-hemijska karakterizacija. DLS merenja su pokazala da je distribucija veličine nanokompozita FNP/Fe²⁺ ostala u istom obimu kao i distribucija veličine FNP, između 11- i 60 nm (Slika 38). Ovi rezultati pokazuju da joni gvožđa nisu uticali na veličinu FNP-a i nisu poremetili prirodnu tendenciju fulerenola

da se samoorganizuje u nanočestice. Međutim, joni gvožđa jesu uticali na promenu zeta potencijala FNP-a, pomerajući ga ka pozitivnijim vrednostima (Slika 39), što ukazuje da su joni Fe^{2+} vezani za FNP elektrostatičkim interakcijama. TEM analiza uzoraka nanokompozita FNP/ Fe^{2+} i FNP je pokazala usklađenost sa DLS merenjima, otkrivajući prisustvo čestica veličine od 10nm do 50 nm (Slika 40). TEM-EDS analiza je potvrdila povećano prisustvo jona gvožđa unutar nanokompozita FNP/ Fe^{2+} (Slika 41) što je u saglasnosti sa merenjima zeta potencijala nanokompozita FNP/ Fe^{2+} . Tako je naelektrisanje FNP/ Fe^{2+} za 18.4 mV pozitivnije od FNP-a (Slika 39), implicirajući da su joni gvožđa uspostavili elektrostatičke i koordinativne interakcije sa polianjonskim nanočesticama fulerenola. Vrednosti veličina nanočestica i njihovog zeta potencijala su od velikog značaja, jer ovi parametri diktiraju stopu unosa nanočestica u ćelije. Kada nanočestice uđu u krvotok, one stupaju u interakcije sa različitim proteinima krvne plazme. Nakon nekoliko minuta, kada se uspostavi ravnoteža, proteini formiraju koronu oko nanočestica, koja novonastaloj nano-platforni daje novi biološki identitet (Baimanov i sar., 2019). Važnost naelektrisanja nanočestice se ogleda u činjenici da je ona u korelaciji sa brojem proteina adsorbovanih na površini nanočestice (Deng i sar., 2009). Proteini sa pI 5.5, kao što je IgG koji je odgovoran za proces opsonizacije, se preferencijalno adsorbuju na pozitivno naelektrisanim nanočesticama (Aggarwal i sar., 2009). Fagocitne ćelije, predominantno reaguju jače sa mikročesticama, nego sa nanočesticama, povećavajući njihov klirens iz organizma. Nefagocitne ćelije usvajaju više katjonskih nanočestica, dok fagocitne ćelije preferiraju unos anjonskih nanočestica. Posledica veće stope unosa nanočestica je obično i veći biološki efekat (Fröhlich, 2012). Još jedna bitna osobina novosintetisanog nanokompozita FNP/ Fe^{2+} leži u tome što su za njegovu sintezu upotrebljeni Fe^{2+} joni koji se ne vezuju za protein krvne plazme, transferin, i na taj način se, bar delimično, izbegava narušavanje ravnoteže samog nanokompozita i njegovo zadržavanje u krvotoku.

Nakon nanokarakterizacije nanokompozita FNP/DOX-a, ispitivane su njegove biološke osobine. Istraživanja Jović i saradnika su pokazala da nanokompozit FNP/DOX ima jače citotoksično dejstvo u odnosu na sam DOX i da sprečava oporavak malignih ćelija (Jović i sar., 2016). U ovoj doktorskoj tezi je analiziran potencijalni mehanizam citotoksičnog delovanja nanokompozita FNP/DOX. Ispitivanje unosa FNP/DOX u

ćelijama i distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana bi mogli da objasne različit citotoksičan efekat FNP/DOX u odnosu na sam DOX. Analiza unosa DOX-a i FNP/DOX-a u MCF-7 i MDA-MB-231 ćelije pokazala je da nanokompozit FNP/DOX povećava internalizaciju DOX u oba tipa malignih ćelija nekoliko puta u poređenju sa samim DOX-om. Razlike u načinu internalizacije i opsegu ćelijskog unosa slobodnog DOX i različitih nanočestica koje nose DOX su prethodno primećene i u istraživanjima drugih autora (Dai i sar., 2008; Upadhyay i sar., 2010; Zou i sar., 2012). DOX u ćelije ulazi na dva načina, putem difuzije i putem nosača (Bates i sar., 1985; El-Kareh i Secomb, 2005) i tom prilikom se distribuira i u citoplazmi i u jedru. Nasuprot tome, većina nanočestica u ćeliju ulazi endocitozom i akumulira se prevashodno u citoplazmi (Dai i sar., 2008). Sa jedne strane, DOX unet u ćelije preko nanonosaa putem endocitotskih vezikula ima smanjenu mogućnost da kontaktira sa transmembranskim pumpama koje izbacuju DOX van ćelije (Shalviri i sar., 2012), pri čemu se prevazilazi rezistentnost na lek. Sa druge strane, formiranje para između negativno naelektrisane nanočestice i DOX dovodi do maskiranja pozitivnog naelektrisanja DOX-a što olakšava difuziju DOX kroz ćelijske membrane. Takođe, što je DOX više neutralizovan unutar ćelije manje je dostupan efluksnim pumpama pozicioniranim na ćelijskoj membrani, što sprečava pojavu rezistentnosti na lek (Dong i Mumper 2010). Pretpostavka je da na sličan način deluje i nanokompozit FNP/DOX, odnosno da FNP olakšava difuziju DOX-a u ćeliji i sprečava kontakt DOX-a sa transmembranskim pumpama i njegovo izbacivanje iz ćelije te time povećava unos i koncentraciju DOX u ćelijama.

Dodatno se primećuje da je unos oba jedinjenja bio bolji kod MCF-7 nego kod MDA-MB-231 što bi moglo dati objašnjenje za bolje citotoksične efekte FNP/DOX-a kod MCF-7 ćelija. (Jović i sar 2016). Razlog za različitu osetljivost MCF-7 i MDA-MB-231 leži u različitim molekularnim karakteristikama ova dva subtipa ćelija. MCF-7 ćelije spadaju u kategoriju luminalnih ćelija tipa A čiji imunoprofil podrazumeva da su ER⁺ (pozitivne estrogene receptore), PR⁺ (pozitivne za progesteronski receptor) i HER2⁻ (negativne za humani receptor faktora rasta tipa 2). Pored ovakvog imunoprofila, MCF-7 se odlikuju i drugim osobinama kao što su nizak nivo nuklearnog proteina Ki67 i time da često daju odgovor na hemoterapiju. Za razliku od ovih ćelija, MDA-MB-231 ćelije

odlikuje imunoprofil koji podrazumeva odsustvo receptora za estrogen, progesteron i humani receptor faktora rasta tipa 2 (ER⁺, PR⁺ i HER2⁺). Dodatne molekularne osobine koje odlikuju MDA-MB-231 ćelije uključuju prisustvo visokog nivoa nuklearnog proteina Ki67, E-kadherina, kladina-3, kladina-4 i nizak nivo kladina-7 kao i srednji odgovor na hemoterapiju (Neve i sar., 2006; Prat i sar., 2010;). Verovatno je da veće prisustvo kladina i E-kadherina kod MDA-MB-231 ćelija u odnosu na MCF-7 ćelije, a koji čine važnu komponentu *zonula occludens*, predstavljaju barijeru koja kontroliše protok molekula u međućelijski prostor pa samim tim i internalizaciju različitih molekula u ćelije. Takođe, razlika u osetljivosti ova dva subtipa malignih ćelija na DOX i FNP/DOX može poticati i od aktivacije/inaktivacija brojnih signalnih puteva koji vode različitom odgovoru na lekove (Vasilevskaya i O'Dwyer, 2003). Tako je pokazano da je ekspresija ERK1/2 i njegove aktivne forme manja kod MDA-MB-231, u odnosu na MCF-7 ćelija nakon tretmana DOX-om (Taherian i Mazoochi, 2012). Stoga je moguće da razlike u osobinama MCF7 i MDA-MB-231 utiču na različitu osetljivost ovih ćelija u tretmanima sa DOX-om i FNP/DOX-om.

Pored analize unosa DOX-a i FNP/DOX-a u ćelije, u ovoj doktorskoj tezi ispitivan je i njihov uticaj na distribuciju malignih ćelija dojke po fazama ćelijskog ciklusa. Opšte je prihvaćeno da zaustavljanje ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa predstavlja indikator oštećenja DNK (Kastan i Bartek i sar., 2004). U ovoj doktorskoj tezi je pokazano da DOX povećava procenat MCF-7 ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa, u odnosu na kontrolne ćelije nakon 24 h i 48 h, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji su takođe pokazali da DOX u različitim ćelijskim linijama povećava broj ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa i vodi ih u apoptozu (Kastan i Bartek i sar., 2004; Lüpertz i sar., 2010; Park i sar., 2012). Primena nanokompozita FNP/DOX dovodi do smanjenja broja MCF-7 ćelija u G2M fazi ćelijskog ciklusa u odnosu na samostalnu primenu DOX-a. Slični rezultati su dobijeni i kod MDA-MB-231 ćelija gde je primena FNP/DOX-a dovela do smanjenja procenta ćelija u G2/M fazi u odnosu na samostalnu primenu DOX-a. Ovi rezultati jasno ukazuju da DOX primenjen samostalno dovodi do oštećenja malignih ćelija dojke. Međutim manji procenat ćelija u G2/M fazi nakon tretmana FNP/DOX-om ukazuje da ovaj nanokompozit smanjuje oštećenje ćelija izazvano DOX-om. Iz ovog se može pretpostaviti da promene u fazama ćelijskog ciklusa nisu

odgovorne za veću citotoksičnost FNP/DOX-a u odnosu na sam DOX. Međutim, poznato je da DOX koristi više različitih mehanizama preko kojih dovodi do oštećenja ćelija (Slika 6). Sasvim je moguće da DOX unet preko FNP-a u formi nanokompizita aktivira neke druge mehanizme odgovorne za pojačanu citotoksičnost FNP/DOX-a u odnosu na samostalnu primenu DOX-a kod MCF-7 i MDA-MB-231 ćelija.

Primena DOX-a u tretmanima tumora rezultuje u većem broju neželjenih efekata među kojima je naizraženiji kardiotoksičnost (Reeve i sar., 2007; Jing i sar., 2013; Ma i sar., 2013, Tang i sar., 2018). Iz tog razloga je u ovoj tezi ispitan kardiotoksičan efekat DOX i FNP/DOX na imortalizovanoj liniji kardiomiocita miševa (HL-1). Ovi eksperimenti su pokazali da je primena nanokompozita FNP/DOX dovela do značajno manjeg citotoksičnog efekta u odnosu na samostalnu primenu DOX što se ogleda u 9 puta većoj IC_{50} vrednosti FNP/DOX u odnosu na DOX kod mišijih kardiomiocita. Ovaj rezultat ukazuje da primena FNP/DOX može ublažiti negativne efekte DOX na kardiomiocite. Mora se istaći da primena FNP/DOX samo ublažuje ali ne dovodi do potpunog protektivnog efekta na HL-1 ćelijama jer se i dalje zapaža smanjenje broja HL-1 ćelija tretiranih nanokompozitom FNP/DOX u odnosu na kontrolne vrednosti. Ovaj rezultat ukazuje da primena FNP/DOX može da ublaži citotoksične efekte DOX na zdravim ćelijama. Jedan od ciljeva primene DOX koji je dopremljen u ćelije putem različitih nanočestica je da pokazuje veću citotoksičnost u poređenju sa slobodnim DOX na malignim ćelijama ali sa manjim efekom na zdrave ćelije. Ova osobina DOX, koji je dopremljen nanočesticama, pre svega zavisi od veličine, vremena izlaganja, površinskih modifikacija kao i od koncentracije nanočestica (Dai i sar., 2008; Nielsen i sar., 2008; Upadhyay i sar., 2010; Jović i sar., 2016). Tako je, na primer, za konjugat fulerenol-DOX ustanovljeno da suprimira proliferaciju malignih ćelija *in vitro* i zaustavlja ih u G2/M fazi ćelijskog ciklusa, dok je *in vivo*, na tumorima miševa, ustanovljeno da poseduje sličnu antitumorsku efikasnost kao sam DOX, ali bez izraženih tipičnih štetnih efekata: značajno smanjenje telesne težine, opšta slabost, gubitak dlake, kardio-, nefro- i hepatotoksičnost (Chaudhuri i sar., 2009a). Slični rezultati su dobijeni i primenom hibridne polimerne nanočestice gde su kombinovani fulerenol $C_{60}(OH)_{22}$ i DOX inkapsulirani u polimernu micelu, koja je značajno redukovala sistemsku toksinost, a posebno kardiotoksičnost i nefrotoksičnost, kod

miševa sa tumorom dojke (Tang i sar., 2018). Sa druge strane, Bogdanović i saradnici su testirali sam FNP na osetljivim malignim ćelijskim linijama, u model sistemu citotoksičnosti koja je indukovana DOX-om, i utvrdili da FNP aplikovan 30 min pre DOX-a u velikoj meri smanjuje citotoksičnost DOX-a, čak i u nanomolarnim koncentracijama (Bogdanović i sar., 2004). Primećeni efekti FNP-a primenjenog pre DOX-a, mogu se objasniti time, da FNP ima dvojaku prirodu u zavisnosti od uslova sredine u kojoj se nalazi. FNP se može ponašati i kao prooksidans i kao antioksidans (Petrovic i sar., 2015; Djordjevic i sar., 2015). Shodno tome, može se pretpostaviti da kod nekih tipova ćelija FNP deluje sinergistički ili aditivno sa DOX-om, pojačavajući citotoksični efekat, dok kod drugih tipova ćelija deluje antagonistički, ublažavajući negativne efekte primene DOX-a. Sagledavajući efekte FNP/DOX-a i DOX-a na MCF-7 i MDA-MB-231 ćelijama kao i na imortalizovanim ćelijama kardiomiocita miša, zapaža se da FNP/DOX ima pojačano citotoksično dejstvo na malignim linijama dojke (Jović et al. 2016), a delimično smanjuje smrtnost zdravih ćelija kardiomiocita (rezultati ove teze). Ovi podaci ukazuju da primena FNP-a može da poboljša biološke efekte DOX-a tokom tretmana tumora, a da istovremeno umanjuje oštećenja zdravih ćelija. Međutim, *in vitro* istraživanja u ovoj tezi nisu mogla da pokažu mehanizame preko kojih FNP ostvaruje ovakve efekte.

Sledeći korak u ovoj tezi je bio da se istraži efekat nanokompozita *in vivo*, na pacovima soja Wistar, pri čemu su izabrana dva organa, srce i jetra, koja trpe najveća oštećenja usled DOX-ske terapije.

Na subćelijskom nivou, kardiomiopatija prouzrokovana DOX je udružena sa indukcijom disfunkcije mitohondrija (Octavia i sar., 2012a; Octavia i sar., 2012b; Varga i sar., 2015; Seke i sar., 2016, Tang i sar., 2018). Istraživanja na svinjama, *in vivo*, pokazuju da tom prilikom dolazi do modifikacije aranžmana mitohondrija koje postaju neuređene usled intraćelijskog edema i cepanja miofibrila. Dodatno dolazi i do remećenja strukture spoljašnje mitohondrijalne membrane i lize mitohondrijalnih kristi (Borović i sar., 2014). Rezultati ove teze potvrđuju rezultate prethodno navedenih autora. Na Slikama 24 i 26 se mogu uočiti mitohondrije sa značajno izmenjenom strukturom nakon DOX tretmana, remeteći energetiku kardiomiocita. Kako srce

zahteva veliku količinu energije da bi pumpalo krv kroz cirkulatorni sistem, ono sadži veliki broj mitohondrija. Imajući u vidu, da su mitohondrije glavni ćelijski kompartmani za produkciju ROS-a, kada se aplicira DOX, nivo ROS-a se povećava, izazivajući jači oksidativni stres. Ono što srce čini još podložnijim oksidativnom oštećenju jeste prisustvo niskog nivoa antioksidativnih enzima, kao što su SOD i katalaza (Doroshov i sar., 1980). Druga posledica oksidativnog stresa je prisustvo lipidne peroksidacije, koja se u ovom eksperimentu manifestuje u formi mijelinskih figura (Slika 24H i Slika 26C-F). Masne kiseline, inkorporirane u lipidima, predstavljaju laku metu slobodnih radikala i oksiduju se do lipidnih peroksida koji učestvuju u formiranju koncentričnih membrana (Mobaraki i sar., 2017). Tokom oksidativnog stresa, oksidaciji ne podležu samo lipidi, već i proteini. Pokazano je da DOX indukuje karbonilaciju i degradaciju proteina C koji se vezuje za miozin srca, promovišući karditoksičnost (Aryal i sar., 2014). DOX formira i kompleks sa kardiolipinom, negativno naelektrisanim fosfolipidom smeštenim u unutrašnjij mitohondrijalnoj membrani, gde obuhvata blizu 15% ukupnih fosfolipida (Goormaghtigh i sar., 1980). Ova interakcija menja fluidnost membrane, kao i aktivnost asociranih proteina, doprinoseći karditoksičnosti (Parker i sar., 2001). Pored efekata na mitohondrijama i drugi ćelijski odeljci trpe promene usled DOX tretmana (Borović i sar., 2014; Seke i sar., 2016). Ove promene obuhvataju remećenje strukture miofibrila, hiperkontrakciju sarkomera, kompromitovan integritet sarkoleme, teško oštećena jedra, unutarćelijski edem i vakuolizaciju citoplazme. Promene su takođe primećene i u intersticijalnom tkivu (Borović i sar., 2014, Seke i sar., 2016). U eksperimentima opisanim u ovoj tezi uočena je dodatna promena, intersticijalna hemoragija. Suprotno opisanim promenama koje izaziva DOX, nanokompozit FNP/DOX u koncentraciji od 4 mg/kg, indukovao je manje povreda na tkivu srca. Ćelije su ostale u dobrom stanju sa euhromatskim jedrima i sintetski aktivnim jedarcima. Miofibrili su zadržali regularnu strukturu i aranžman bez znakova hiperkontrakcije sarkomera. Primećena su polja visoke elektronske gustine, bez jasno vidljivih mitohondrijalih kristi. Interkalatni diskovi su sporadično oštećeni. Međutim, sve ove promene su bile fokalnog i reverzibilnog karaktera (Slika 25). Uočena je i apoptoza sporadičnih limfocita i endotelnih ćelija, ali bez generalnog prisustva inflamacije. Slična slika se dobija i kada se uporede tkiva srca tretirana sa 2 mg/kg FNP/DOX-a i 2 mg/kg DOX-a. Tkiva

tretirana nanokompozitom generalno su bolje morfološki očuvana u odnosu na tkiva tretirana DOX-om. Odsustvo inflamacije ukazuje na potencijalno antagonistički efekat FNP-a u odnosu na DOX. Moguće je da FNP suprimira aktivaciju T i B limfocita (Dragojevic-Simic i sar., 2011; Hirai i sar., 2016). Hirai i saradnici sugerišu da supresivan efekat FNP na stečeni imunitet, ne potiče od prirode fullerenskog derivata, već od njegove sferične strukture (Hirai i sar., 2016) čime se ističe značaj morfologije čestica, pored njihove veličine, naelektrisanja i prisutnih funkcionalnih grupa. Rezultati ultrastrukturne analize, prikazani u ovoj tezi, u dobroj su saglasnosti sa rezultatima istraživanja Tang i saradnika, koji su pokazali da hibridna nanočestica fulerenola ($C_{60}(OH)_{22}$) i DOX-a inkapsulirana u polimer, štiti tkivo srca tj. u njemu nisu uočene promene na mitohondrijama, parenhimalna degradacija, vakuolizacija i intersticijalni edem, a koje su bile uočljive u grupi tretiranoj samo DOX-om (Tang i sar., 2018). Isti autori sugerišu da protekcija tkiva srca kao i sveukupna umanjena sistemska toksičnost potiču od fulerenola koji smanjuje oksidativna oštećenja.

Poređenjem ultrastrukturne morfologije tkiva srca pacova tretiranih sa 2 i 4 mg/kg FNP/DOX uočava se određena razlika. Usled veće koncentracije DOX-a unutar nanokompozita FNP/DOX, očekivao bi se veći stepen oštećenja tkiva srca. Međutim, rezultati ultrastrukturne analize su pokazali suprotno. Kod grupe tretirane sa 2 mg/kg FNP/DOX-om je bilo prisutno više morfoloških promena u poređenju sa tretmanom od 4 mg/kg FNP/DOX-a. Mogući razlog je koncentracija FNP-a u nanokompozitu FNP/DOX. Naime, kod veće doze nanokompozita, koncentracija FNP-a je takođe veća, što implicira veći protektivni efekat fulerenolskih nanočestica na srce, bez obzira na koncentraciju DOX-a.

Jedna od osobenosti eksperimentalnih grupa životinja tretiranih nanokompozitom FNP/DOX jeste bila i adhezija i agregacija krvnih pločica u krvnim sudovima srca. Prethodna istraživanja su pokazala da nanočestice mogu indukovati agregaciju krvnih pločica (Radomski i sar., 2005; Ilinskaya i sar., 2013). Uzimajući u obzir da je periferna zona krvnih pločica bogata glikoproteinima, moguće je da dolazi do njihove interakcije sa nanokompozitom pri čemu se javljaju agregacija i adhezija. Ako se uzme u obzir da su morfologija i naelektrisanje nanokompozita FNP/DOX modifikovani u odnosu na

sam FNP, može se pretpostaviti da su nove osobine nanokompozita uticale na distribuciju krvnih pločica.

Rezultati ultrastrukturne analize su, između ostalog, utvrdili da se u tkivu srca pacova eksperimentalne grupe tretirane nanokompozitom FNP/DOX u koncentraciji 2 mg/kg pojavljuje interćelijski edem, verovatno kao posledica prisustva DOX-a unutar nanokompozita. Međutim, kako se interćelijski edem javlja i kod životinja tretiranih samo sa FNP, moguće je da i sam FNP dovodi do bubrenja ćelija. Slično zapažanje je primećeno i u radu Tang i saradnika (Tang i sar., 2018). Prema prethodnim istraživanjima, mitohondrije predstavljaju ciljna mesta delovanja polihidroksilovanih fulerena (Gelderman-Fuhrmann i sar., 2006; Nakagawa i sar., 2011; Santos i sar., 2013). Poznato je, da je jedan od uzroka bubrenja mitohondrija poremećena homeostaza permeabilnosti mitohondrijalne membrane (Li i sar., 2014), a istraživanja su pokazala da FNP može biti okidač na dozno zavisani način (Yang i sar., 2016). Transmembranski električni potencijal funkcionalnih mitohondrija se prostire kroz unutrašnju membranu i nastaje prenosom protona iz matriksa u intermembranski prostor. Uzimajući u obzir da je FNP negativno naelektrisan, očekuje se njegovo nakupljanje u pozitivno naelektrisanom intermembranskom prostoru mitohondrija i samim tim favorizovanje interakcija FNP-a i mitohondrijalne membrane (Santos i sar., 2013). Remećenje propustljivosti membrane mitohondrija i njihovo bubrenje indukuje sintezu tranzitivne permeabilne pore u unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani što za posledicu ima kolabiranje membranskog potencijala, smanjenje fluidnosti membrane, kao i opadanje nivoa ATP (Yang i sar., 2016). Citotoksičnost FNP-a, pored mitohondrijalne disfunkcije, može biti asocirana i sa remećenjem strukture citoskeleta i akumulacijom autofagnih vakuola što sve vodi vidljivim ultrastrukturnim promenama (Johnson-Lyles i sar., 2010).

Nekoliko studija je pokazalo da su metaboliti DOX-a koji nastaju u ćelijama srca povezani sa različitim mehanizmima toksičnosti. Wang i saradnici su otkrili metabolički put koji uključuje hidroksilovane metabolite, posebno doksorubicinol, za koji se smatra da ima direktan efekat na kardiomiocite komore, izazivajući njihovu odloženu aktivaciju i/ili inaktivaciju (Wang i sar., 2001). Kod ljudi, hidroksilovani

antraciklini indukuju odloženo pojavljivanje kardiomiopatije, koje se može manifestovati nedeljama ili čak mesecima nakon završene terapije (Licata i sar., 2000). Prema Nagasaki-ju i Fleischer-u, ovi metaboliti se teško odstranjuju iz kardiomiocita, povećavajući aktivaciju kalcijumskih kanala na sarkoplazmatičnom retikulumu, i vodeći ćelijskoj smrti (Nagasaki i Fleischer 1989). Drugi mehanizam toksičnosti uključuje formiranje slobodnih radikala. Prethodne studije su pokazale da su semihinoni kao metaboliti antraciklina citotoksičniji nego izvorni molekuli, kako za zdrave, tako i za maligne ćelije. Generalno postoji saglasnost da semihinonski antraciklini mogu postići svoju citotoksičnost olakšavajući alkilaciju ćelijskih makromolekula (Bartoszek 2002) s jedne strane, ili preko generisanja ROS sa druge strane (Octavia i sar., 2012a; Octavia i sar., 2012b). Skorija istraživanja su predložila mehanizam putem koga FNP u kardiomiocitima deluje kao „hvatač” slobodnih radikala (Injac i sar., 2009a; Ye i sar., 2014).

Da bi se ispitala uloga oksidativnog stresa, u efektima DOX-a i FNP/DOX-a, u mišiću srca analizirana je ekspresija dva gena čiji proteinski produkti, katalaza i MnSOD učestvuju u antioksidativnoj odbrani. U grupama životinja koje su primile DOX, ekspresije iRNK za katalazu i MnSOD mogu da ukažu na prisustvo oksidativnog stresa u srcu. Nanokompozit FNP/DOX je samo u određenoj dozi doveo do smanjenja ekspresije iRNK za katalazu, međutim, istovremeno je povećao novo iRNK za MnSOD u odnosu na DOX-sku grupu. Ovi rezultati ne mogu povezati oksidativni stres sa efektima DOX-a i FNP/DOX-a koji su dobijeni na tkivu srca. Treba uzeti u obzir da se ovde radi o analizi nivoa ekspresije iRNK za samo dva antioksidativna enzima. Ekspresioni nivoi iRNK drugih antioksidativnih enzima kao što su ekstraćelijski ili intraćelijski SOD, GST i dr. nisu određivani u ovoj tezi. Sasvim je moguće da tretmani DOX-a i FNP/DOX-a deluju na neke od drugih komponenti antioksidativne odbrane dovodeći do promena koje bi se mogle povezati sa histološkim nalazima na srcu. Još jedan faktor može da utiče na rezultate analize iRNK za katalazu i MnSOD u tkivu srca. Analiza je rađena u homogenatu celog srca, koje se sastoji od više tipova ćelija, uključujući kardiomiocite, fibroblaste, limfocite i endotelne ćelije, pri čemu promene u oksidativnom statusu jednog tipa ćelija može biti zamaskiran oksidativnim statusom u drugim tipovima ćelija. Sagledavajući prisustvo mijelnskih figura, koje su posledica

lipidne peroksidacije kod tretmana DOX-om, ali ne i kod tretmana FNP/DOX-om, može se reći da FNP pokazuje određeni stepen zaštite od oksidativnog stresa u srcu pacova izazvanim DOX-om, ali se mehanizam za ovakav nalaz mora detaljnije ispitati.

Poznato je da DOX predstavlja i okidač za faktore koji promovišu apoptozu, a istovremeno inhibira faktore koji sprečavaju apoptotičke procese (Wang i sar., 2011; Monti i sar., 2013). Zbog toga su u ovoj tezi praćeni i efekti DOX-a i FNP/DOX-a na ekspresiju gena čiji proteinski produkt promoviše apoptozu, *Bax*, i gena čiji proteinski produkt sprečava apoptozu, *Bcl-2*. Analiza ekspresije ovih gena nije mogla jasno da ukaže na potencijalni mehanizam koji bi mogao da objasni apoptozu koja je detektovana na histološkim preparatima. Iako je iRNK *Bax* gena bila pozitivno regulisana DOX-om u dozi od 2 mg/kg, predtretman sa FNP-om nije remenio ovu ekspresiju. Sa druge strane, DOX je povećao ekspresiju antiapoptotskog *Bcl-2* gena, u poređenju sa kontrolnom grupom, međutim, ovaj efekat je zavisio od doze primenjenog DOX-a. Primećeno je da kod životinja tretiranih FNP/DOX-om postoji veći relativni nivo iRNK za *Bcl-2* u odnosu na grupu životinja gde je DOX samostalno primenjen. Ovaj podatak je od značaja, jer prema modelu heterodimerizacije *Bcl-2* i *Bax* proteina, može doći do inhibicije proapoptotske funkcije *Bax*-a (Chen i sar., 2007; Düssmann i sar., 2010). Naime, u ovoj tezi, veći nivo iRNK za *Bcl-2* koji se zapažaju u grupi životinja tretiranoj sa 2 mg/kg FNP/DOX-a u poređenju sa grupom tretiranom sa istom koncentracijom DOX-a, može potencijano da spreči negativne efekte DOX-a na tkivo srca. Međutim, limitacija analize na molekularnom nivou jeste da je ispitivana iRNK za jedan proapoptotski i jedan antiapoptotski gen, bez praćena nivoa ovih proteina u ćeliji ili samog procesa apoptoze. Moguće je, da bi analize više parametara dale jasniji odgovor u vezi sa procesom apoptoze nakon tretmana DOX-om i FNP/DOX-om.

U cilju detaljnijeg ispitivanja aktivnosti sistema antioksidative zaštite, jedan od pravaca istraživanja, u ovoj tezi, bio je usmeren i na jetru. U ovom organu se vrši hemijska transformacija mnogih jedinjenja kako bi njihovo štetno dejstvo bilo ublaženo i kako bi lakše bili eliminisani iz organizma. Slično se dešava i sa DOX-om koji se u jetri uz pomoć citohrom P450 zavisne reduktaze dominantno prevodi u doksorubicinol koji je bolje rastvoran u vodi i samim tim podložniji izlučivanju (Kassner i sar., 2008).

Međutim, kao što je već pomenuto, doksorubicinol takođe izaziva oštećenja ćelija i tkiva koja mogu biti čak i veća nego oštećenja nastala dejstvom samog DOX-a (Boucek i sar., 1987). Prethodna istraživanja su pokazala da FNP može da suprimira nivo mikrozomalnih enzima u jetri kao što su NADPH-citohrom P450 zavisne reduktaze i monooksigenaze (Ueng i sar., 1997), kao i nivo mitohondrijalne oksidativne fosforilacije (Grebowski i sar., 2013), što bi u krajnjoj liniji vodilo slabijoj transformaciji DOX-a u doksorubicinol i samim tim njegovom manjem prisustvu u sistemskoj cirkulaciji i manjoj toksičnosti.

Rezultati ultrastrukturne analize tkiva jetre tretiranih DOX-om su skladu sa prethodnim istraživanjima (Pedrycz i sar., 2003, Kalender i sar., 2005). U ovoj doktorskoj tezi je pokazano da tretman DOX-om dovodi do promena na mitohondrijama, generiše mijelinske figure, apoptozu i nekrozu hepatocita, onkozu endotlnih ćelija i oštećenja krvnih sudova sa ekstravazacijom eritrocita. Sve posmatrane promene su bile na višem nivou kod primene doze od 4 mg/kg DOX-a. U poređenju sa ovim rezultatima, ultrastrukturna analiza tkiva jetre tretiranih FNP/DOX-om pokazala je da se posmatrana ćelije nalaze u daleko boljem stanju. Apoptoza je primećena samo kod pojedinačnih ćelija, dok su vakuolizacija hepatocita, intercelularni edem i intersticijalna hemoragija bili daleko manje izraženi u odnosu na DOX-sku grupu. Ovde treba istaći da su sve pomenute promene bile u mnogo manjoj meri izražene u grupi tretiranoj sa 2 mg/kg FNP/DOX-om nego u grupi tretiranoj sa 4 mg/kg FNP/DOX. Mitoza hepatocita, primećena u grupi tretiranoj sa 2 mg/kg FNP/DOX-a govori u prilog tome da su tretirane ćelije jetre bile u dobrom stanju. Deoba hepatocita je uočena i nakon prime FNP-a, nagoveštavajući time da nanokompozit pri određenim koncentracijama predstavlja prihvatljiv tretman koji ostavlja ćelije sa mitotičkim potencijalom. Istraživanja ranijih autora su potvrdila da antioksidativni agensi umanjuju akumulaciju leukocita u tkivu jetre (Yagmurca i sar., 2007), što je u saglasnosti sa rezultatima ove teze gde nisu uočeni znakovi inflamacije tkiva. Tokom ultrastrukturne analize tkiva jetre, uočeno je da dolazi do bubrenja mitohondrija nakon tretmana sa FNP-om, što se može objasniti time da je došlo do narušavanja homeostaze mitohondrijalne membrane (Dobrovolskaia i sar., 2008; Johnson-Lyles i sar., 2010; Rokitskaya i sar., 2016). Izmenjena permeabilnost mitohondrijalne membrane može biti prouzrokovana

lipidnom peroksidacijom koja vodi formiranju neselektivnih pora u membrani (Sokolov i sar., 1981, Lebedev i sar., 1982). Yang i saradnici su pokazali da fulerenol ($C_{60}(OH)_{44}$) može biti okidač bubrenja mitohondrija na dozno zavisani način (Yang i sar., 2016). U istraživanjima ove doktorske teze, povećana elektronska gustina mitohondrija i znatne varijacije u veličini mitohondrija su primećene nakon upotrebe FNP-a u tretmanu. Ultrastrukturnom analizom, dodatno je utvrđeno prisustvo mijelinskih figura i apoptoze endotelних ćelija i hepatocita. Međutim, sve opisane promene su bile fokalnog karaktera. Retke depozicije fibrina i krvnih pločica, primećene su u grupi tretiranoj sa 4 mg/kg FNP/DOX-om (Slika 31) i predstavljaju jedinstvenu karakteristiku rezultata ovih eksperimenata, kao što je to primećeno i u tkivu srca. Periferna zona krvnih pločica koja je u kontaktu sa nanokompozitom, može voditi njihovoj adheziji i agregaciji (Wen i sar., 2002; Radomski i sar., 2005). S obzirom da su površinski hemijski efekti nanočestica na vezivanje proteina većinom nepoznati, urađene su različita *in silico* istraživanja sa ciljem da se otkriju molekularni mehanizmi koji se nalaze u pozadini ovih interakcija. Ove studije su pokazale da se hidroksilovani fulerenol $C_{60}(OH)_{20}$ može vezati za tubulin (Ratnikova i sar., 2011) i taq DNK polimerazu (Nedumpully Govindan i sar., 2012) preko vodoničnih veza. U drugom istraživanju, gde je ispitivana interakcija FNP-a sa različitim model membranama, FNP je imao nizak afinitet prema eukariotskim membranama. FNP se zadržavao u hidrofilnom delu membranskog dvosloja, mada vodonične veze sa holesterolom ne mogu biti isključene (Brisebois i sar., 2012). Uzimajući u obzir sve prethodno izneto, tačan molekularni mehanizam fenomena adhezije i agregacije krvnih pločica ostaje da bude rasvetljen.

Histološki rezultati Injac i saradnika nisu potvrdili hepatoprotektivni efekat fulerenola u pretretmanu sa DOX-om (Injac i sar., 2008c) dok rezultati iz ove teze sugerišu postojanje protekcije. Primena nanokompozita se pokazala kao bolji pokušaj umanjenja štetnih efekata izazvanih DOX-om u odnosu na primenu fulerenola u pretretmanu. Naime, FNP/DOX nanokompozit produkuje mnogo manje oštećenja u tkivu jetre nego samostalno primenjen DOX u istoj dozi.

S obzirom da DOX dovodi do promena na mitohondrijama, a da FNP/DOX smanjuje oštećenja mitohondrija izazvana primenom DOX-a, rađena je analiza iRNK za katalazu

i MnSOD u jetri. Međutim, rezultati iRNK analize za ova dva antioksidativna enzima, nisu mogli da daju jasan odgovor o ulozi oksidativnog stresa na promene u jetri nakon tretmana DOX-om i FNP/DOX-om. Razlog leži u varijabilnosti odgovora katalaze i MnSOD-a nakon tretmana sa DOX-om i FNP/DOX-om (Petrovic i sar., 2018). Praćenje enzimske aktivnosti većeg broja antioksidativnih enzima u jetri nakon tretmana DOX-om i FNP/DOX-om u radu Petrovic i saradnika, mogu da daju odgovor na potencijalni protektivni mehanizma FNP-a. Primena DOX-a dovodi do povećanja nivoa aktivnosti katalaze, SOD i GR, a smanjenja aktivnosti GST i GSH-Px (Srdjenovic i sar., 2010; Petrovic i sar., 2018). FNP/DOX, u nekim dozama smanjuje aktivnosti katalaze, SOD i GR koje su bile indukovane DOX-om, dok povećava aktivnost GST. Na osnovu smanjenja aktivnosti katalaze, SOD i GR kod životinja koja su bile tretirane FNP/DOX-om, u odnosu na samostalnu primenu DOX-a, može se pretpostaviti da je FNP eliminisao ROS, čime je potencijalni umanjio oksidativni stres izazvan DOX-om u tkivu jetre. Kao podrška ovim opažanjima je i istraživanje gde se FNP pokazao kao odličan „hvatač” ROS-a u tkivu jetre pacova (Li i sar., 2016). Uzimajući u obzir da je i ultrastrukturalna analiza otkrila da FNP/DOX indukuje manje oštećenja na tkivu jetre u poređenju sa oštećenjima nastalim primenom DOX-a, zaključuje se da postoje indicije o protektivnom efektu FNP.

Obrazac ekspresije proapoptotskih i antiapoptotskih gena u tkivu jetre, ne ukazuju da je tretman DOX-om ili FNP/DOX-om uticao na pojavu apoptotskih procesa u tkivu jetre. Zapaža se trend povećanja ekspresije iRNK za *Bax* i smanjenja ekspresije iRNK za *Bcl-2* u tkivu jetre, međutim ne može se uočiti pravilnost u ekspresiji ovih gena nakon tretmana. Ovi rezultati su u saglasnosti sa ultrastrukturnom analizom tkiva jetre gde je nakon tretman DOX-om i FNP/DOX-om, ustanovljena apoptoza samo u pojedinim endotelnim ćelijam i pojedinim hepatocitima koja je bila fokalnog karaktera. Iz ovoga se može pretpostaviti da tretman DOX-om i FNP/DOX-om ne dovodi značajnije do apoptoze u tkivu jetre.

Brojni eksperimentalni podaci i kliničke studije su pokazali da tumori imaju tendenciju da akumuliraju jone gvožđa (Fonseca-Nunes i sar., 2013; Torti, 2015). Povećan nivo intracelularnog gvožđa promoviše feropoptozu, specifičnu formu ćelijske smrti (Dixon

i sar., 2012). A terapije bazirane na dopremanju viška gvožđa tumorskim ćelijama bi mogle biti od pomoći prilikom aktiviranja feropoptoze kod maligniteta (Marzenell i sar., 2013). Nadalje, gvožđe sa DOX-om gradi kompleks koji posreduje u generisanju slobodnih radikala vodeći oštećenju ćelija (Myers, 1998; Swain i Vici, 2004; Ishikawa i sar., 2014). Međutim, skorija istraživanja ovaj stav dovode u pitanje, tvrdeći suprotno, da preopterećenje gvoždem ne pojačava kardiotoksičnost indukovanu DOX-om (Guenancia i sar., 2015). Uzevši prethodno izneto u obzir, u ovoj tezi se pristupilo i ispitivanju efekata nanokompozita FNP/Fe²⁺ na zdravim tkivima srca i jetre pacova u predtretmanu sa DOX-om. Na subćelijskom nivou, nanokompozit FNP/Fe²⁺ je indukovao sporadično prisutne, neznatne promene. Intracelularni edem, vakuolizacija i apoptoza endotelnih ćelija su primećeni u oba tkiva, i u srcu i u jetri (Slika 42C,D i Slika 43C,D). Kod tkiva srca regularna struktura interkalatnih diskova unutar miofibrila je ostala inatknata. Generalno posmatranano, morfologija srca i jetre je ostala očuvana. Ukoliko se uporede težine povreda prouzrokovane nanokompozitom FNP/Fe²⁺ i FNP aplikovanim samostalno, primećuje se da FNP prouzrokuje veći tokičan efekat. U eksperimentanoj grupi gde je primenjen samo FNP (Slika 42B), uočen je intracelularni edem između miofibrila izazivajući njihovo razdvajanje. Cepanje miofibrila je, takođe, bilo fokalno prisutno kao i poremećena struktura interkalatnih diskova. U mitohondrijama su primećene oštećene kriste zajedno sa rupturama spoljašnje membrane, dok su u intersticijalnom tkivu uočene edematozne endotelne ćelije sa fenomenom kariolize. U tkivu jetre (Slika 43B) su bile prisutne mijelinske figure, mikrovezikularne masne promene i autofagne vakuole. Došlo je i do intersticijalne hemoragije i pojave fenomena emperiopoleze. Upoređujući efekte izazvane nanokompozitom FNP/Fe²⁺ i FNP, nameće se zaključak da je FNP taj, koji je odgovoran za negativne efekte, a ne joni gvožđa. Yang sa saradnicima je pokazao da polihidroksilovani fulereni C₆₀(OH)₄₄ pojačavaju propustljivost mitohondrijalne unutrašnje membrane za jone vodonika i kalijuma, i time iniciraju bubrenje mitohondrija i njihovu nefunkcionalnost (Yang i sar., 2016).

U grupi gde je primenjen nanokompozit FNP/Fe²⁺, oksidativni stres je redukovano (Slika 45). Bubrenje mitohondrija izazvano fulerenolom može biti efikasno otklonjeno inhibitorima mitohondrijalne tranzicione pore, kao što su: ciklosporin A, adenzin

difosfat, rutenijum crveno i etilendiamintetraacetatna kiselina (Yang i sar., 2016). Iz ovoga proizilazi hipoteza, da je moguće, da joni gvožđa unutar nanokompozita FNP/Fe²⁺ sprečavaju hidroksilne grupe fulerenola da interaguju sa polarnim regionima proteina, u različitim ćelijskim kompartmanima, doprinoseći tako ćelijskoj protekciji, što nadalje, prouzrokuje manje oštećenja. U prilog ove hipoteze ulaze i eksperimenti vršeni na magnetnim mikrokapsulama izgrađenim od fulerenola i Fe³⁺ koji su povezani koordinativnim vezama, gde je izmereno da pomenute mikrokapsule uklanjaju hidroksil radikale produkovane od strane vodonik peroksida, potvrđujući na taj način antioksidativna svojstva fulerenola (Chen i sar., 2019). U istom istraživačkom radu, autori su dokazali da opisane mikrokapsule utiču i na poboljšanje ćelijskog vijabiliteta, kada su izložene vodonik peroksidu, u odnosu na ćelije koje nisu bile pretretirane mikrokapsulama, što je sve zajedno u sprezi sa fulerenolom kao „hvatačem” slobodnih radikala.

Dalje je ispitivano da li pretretmana FNP/Fe²⁺-om može da spreči štetne efekte DOX-a na srcu i jetri. Uticaj DOX-a na srce i jetru, odražava se toksičnim efektima koji se manifestuju u formi mijelinskih figura, vakuolizacije, bubrenja, prisustvu intracelularnog edema i hemoragije. Opisane promene su u dobroj saglasnosti sa prethodnim rezultatima naučnih istraživanja (Childs i sar., 2002; Yagmurca i sar., 2007; Borović i sar., 2014; Seke i sar., 2016; Petrovic i sar., 2018).

Morfologija kardiomiocita i hepatocita, u grupi tretiranoj nanokompozitom FNP/Fe²⁺ 1 h pre aplikacije DOX-a, dobro je očuvana u poređenju sa grupom tretiranom samo DOX-om. Uzorci tkiva iz grupe tretirane nanokompozitom 1 h pre DOX-a su pokazali sledeće promene: oštećenje unutrašnje mitohondrijalne membrane, dilataciju sarkoplazmatskog retikuluma, prisustvo intra i ekstracelularnog edema, ekstrasvazaciju eritrocita, apoptozu endotelnih i glatkih mišićnih ćelija. Međutim, sve ove promene su bile fokalnog karaktera. U tkivu srca, vidljiva je i adhezija i agregacija platela, koja može biti posledica kontakta platela sa nanokompozitom FNP/Fe²⁺. Periferna zona platela je bogata glikoproteinima koji interaguju sa nanočesticama i izazivaju aktivaciju platela (Engin i sar., 2017; Ta i sar., 2017). U tkivu jetre, u istoj eksperimentalnoj grupi, uočene su depozicije kolagenih fibrila u intersticijumu.

Poznato je da hepatične stielatne ćelije, kao odgovor na povredu, mogu da se transformišu u ćelije slične miofibroblastima i da produkuju kolagen tipa I, koji vodi pojavi fibroze (Alcolado i Iredale 1997). Međutim, ono što treba istaći, jeste da je većina tkiva jetre ostala intaktna, a da su sve nabrojane promene primećene samo sporadično.

Analiza ekspresije katalaze i MnSOD u tkivu srca nije pokazala potencijni mehanizam protektivnog delovanja FNP/Fe²⁺. Odgovori ova dva antioksidativna enzima nakon tretman su varijabilni što onemogućuje izvlačenje odgovarajućih zaključaka. FNP samostalno ne remeti iRNK za katalazu i MnSOD tkivu srca, ali dovodi do blagog povećanja ekspresije katalaze, odnosno smanjenja iRNK MnSOD u tkivu jetre. Slične varijabilnosti u odgovorima iRNK za ova dva enzima su pokazane i kod primene FNP/Fe²⁺.

Analiza ekspresije katalaze i MnSOD u tkivu srca nije mogla da da jasan odgovor u ulozi oksidativnog stresa nakon tretman DOX-om i FNP/Fe²⁺ 1 h pre DOX-a. Odgovori ova dva antioksidativna enzima su bili varijabilni, što onemogućuje izvlačenje odgovarajućih zaključaka. Može se zapaziti, da primena DOX-a dovodi do povećanja iRNK za oba enzima u tkivu jetre, dok FNP/Fe²⁺ dovodi do smanjenja ekspresije ova dva enzima. Na osnovu rezultata dobijenih iz tkiva jetre bi se eventualno moglo pretpostaviti da FNP/Fe²⁺ umanjuje oksidativni stres izazvan primenom DOX-a. Ovi rezultati su u skladu sa ultrastrukturnom analizom jetre gde je pokazano da DOX dovodi do promena koje su povezane sa prisutnim oksidativnim stresom, dok primena FNP/Fe²⁺ 1 h pre aplikacije DOX-a, redukuje ove promene. Jedna od hipoteza koje objašnjavaju na koji način FNP/Fe²⁺ deluje protektivno u tretmanu sa DOX-om se odnosi na zaštitno svojstvo fulerenola, koji je kao što je već ranije naglašeno, dobar „hvatač” slobodnih radikala (Djordjević i sar., 2004; Mirkov i sar., 2004; Li i sar., 2016; Wang i sar., 2018). Druga hipoteza uzima u obzir osobinu fulerenola kao polidentatnog liganda koji ima sposobnost da formira komplekse sa prelaznim metalima (Heimann i sar., 2015, Chen i sar., 2019) i gde je moguće da je višak jona gvožđa, otpušten nakon tretmana sa DOX-om, „neutralisan” od strane FNP-a, sprečavajući na taj način oksidativna oštećenja. Naime, pod fiziološkim uslovima, gvožđe se u ćeliji skladišti uz

pomoć feritina kao gvožđe(III)-hidroksid (Thiel i sar., 1983). Međutim, doksorubicinol utiče na homeostazu gvožđa tako što ga uklanja iz katalitičkog Fe-S klastera citoplazmatske akonitaze, koja postaje ireverzibilno inaktivirana, ali zadržava funkciju gvožđe-regulatornog proteina -1 (IRP-1) (Minotti i sar., 2001). Ovaj IRP-1 protein se vezuje za odgovarajuća mesta na iRNK za feritin i inhibira njegovu translaciju, što rezultuje u enormnom otpuštanju slobodnog gvožđa u ćeliji (Minotti i sar., 1998).

Međutim ostaje pitanje zašto ovaj protektivni efekat nanokompozita FNP/Fe²⁺ nije vidljiv i u tkivima srca. Pretpostavka je, da genska ekspresija MnSOD u tkivu srca može biti zavisna od koncentracije DOX-a, kao i vremena izloženosti DOX-u, ali je dalje ispitivanje potrebno da bi se dodatno razjasnili mehanizmi negativne regulacije.

Pored svih gore navedenih pozitivnih efekata nanokompozita FNP/Fe²⁺, iz farmakološke perspektive, aplikacija nanokompozita može imati i svoja ograničenja. Jedan od izazova, bi bio zahtev za svežom pripremom nanokompozita, što komplikuje celu aplikaciju. Zatim, potencijalni pacijenti bi morali da prime dve infuzije, prvu sa nanokompozitom, za kojom bi išla, nakon 1 h infuzija sa DOX-om. I konačno, pretretman nanokompozitom bi mogao biti kontraindikovano kod pacijenata koji imaju metaboličke poremećaje u jonima gvožđa ili kalcijuma, s obzirom da se FNP ponaša kao helator ovih metala (Anderson and Barron 2005). Aplikacija nanokompozita FNP/Fe²⁺ ne mora biti ograničena samo na kombinaciju sa DOX-om. Drugi lekovi, koji izazivaju oksidativni stres, takođe se mogu uzeti u razmatranje i istraživanje, kao što su na primer: Cisplatina, Hlorpromazin, Diklofenak, i drugi (Deavall i sar., 2012)

Sveukupno gledano, istraživanja u ovoj tezi omogućila su vredan uvid u kompleksnu interakciju između FNP-a, DOX-a, ćelija i tkiva. Eksperimentalne postavke ove teze su omogućile bolje razumevanje protektivnog potencijala FNP-a kada se kombinuje sa DOX-om i Fe²⁺, što može imati pozitivne implikacije prilikom dizajniranja antitumorskih lekova.

6. ZAKLJUČCI

- Čestice nanokompozita FNP/DOX su veličine između 20 i 58 nm, imaju naelektrisanje od -6 mV, dok su čestice nanokompozita FNP/Fe²⁺ veličine između 11 i 60 nm, imaju naelektrisanje od -30.8 mV. Nanočestice oba nanokompozita imaju diskoidalnu morfologiju i stabilne su u vodenim sistemima, što ih čini biodostupnim, biokompatibilnim i time pogodnim za primenu u biomedicini.
- FNP dekorisan DOX-om, u obliku nanokompozita FNP/DOX, omogućava značajno obimniji unos DOX-a u ćelije i smanjuje procenat ćelija u G2M fazi ćelijskog ciklusa, u odnosu na samostalnu primenu DOX-a, kod malignih ćelijskih linija dojke.
- Nanokompozit FNP/DOX je pokazao delimično protektivan efekat, umanjujući citotoksičnost komercijalnog DOX-a na imortalizovanoj ćelijskoj liniji kardiomiocita miševa.
- Nanokompozit FNP/DOX izaziva manje štetnih promena na srcu i jetri zdravih pacova soja Wistar, u poređenju sa komercijalnim DOX-om, pri čemu je doza od 4 mg/kg postigla bolji efekat nego doza od 2 mg/kg.
- Promene ekspresije iRNK za dva antioksidativna gena kao i za dva gena koja učestvuju u apoptozi, u srcu i jetri, ne mogu da ukažu na jasan mehanizam preko koga FNP/DOX izaziva manje štetnih promena na srcu i jetri zdravih pacova soja Wistar, u poređenju sa komercijalnim DOX-om.
- Nanokompozit FNP/Fe²⁺ u predtretmanu 1 h pre primene DOX-a, izaziva manje štetnih promena na srcu i jetri zdravih pacova soja Wistar, u poređenju sa komercijalnim DOX-om.

- Promene ekspresije iRNK za dva antioksidativna gena u srcu i jetri ne mogu da ukažu na jasan mehanizam preko koga nanokompozit FNP/Fe²⁺ izaziva manje štetnih promena na srcu i jetri zdravih pacova soja Wistar, u poređenju sa komercijalnim DOX-om.
- U kombinaciji sa DOX-om i gvožđem (Fe²⁺), FNP predstavlja potencijalnu platformu za dopremanje lekova i drugih pozitivno naelektrisanih molekula u tretmanima tumora.

7. LITERATURA

- Ali SS, Hardt JI, Dugan LL. "SOD activity of carboxyfullerenes predicts their neuroprotective efficacy: a structure-activity study. " *Nanomedicine*. 2008; 4:283-294
- Alcolado, R., M. J. P. Arthur, and J. P. Iredale."Pathogenesis of liver fibrosis." *Clinical science*. 1997; 92:103-112
- Anderson R, Barron AR. "Reaction of hydroxyfullerene with metal salts: a route to remediation and immobilization. " *Journal of the American Chemical Society*. 2005; 127:10458–10459
- Angsutararux P, Luanpitpong S, Issaragrisil S. "Chemotherapy-induced cardiotoxicity: overview of the roles of oxidative stress." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2015; 2015
- Arena E, D'Alessandro N, Dusonchet L, Geraci M, Rausa L, Sanguedolce R. "Repair kinetics of DNA, RNA and proteins in the tissues of mice treated with doxorubicin." *Arzneimittelforschung*. 1979; 29:901-902
- Aries A, Paradis P, Lefebvre C, Schwartz RJ, Nemer MN. "Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101:6975-6980
- Arifa RDN, Prospero de Paula T, Madeira MFM, Lima RL, Garcia ZM, Ávila TV, Pinho V et al. "The reduction of oxidative stress by nanocomposite Fullerol decreases mucositis severity and reverts leukopenia induced by Irinotecan." *Pharmacological research*. 2016; 107:102-110
- Armenian SH, Hudson MM, Mulder RL, Chen MH, Constine LS, Dwyer M, Nathan PC et al. "Recommendations for cardiomyopathy surveillance for survivors of childhood cancer: a report from the International Late Effects of Childhood Cancer Guideline Harmonization Group." *The Lancet Oncology*. 2015; 16:123-136
- Armenian SH, Landier W, Hudson MM, Robison LL, Bhatia S. "Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: Survivorship and outcomes." *Pediatric blood & cancer*. 2013; 60:1063-1068
- Arola OJ, Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. "Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis." *Cancer research*. 2000; 60:1789-1792

- Arosio P, and Levi S. "Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2010; 1800:783-92
- Arbustini E, Brega A, and Narula J. "Ultrastructural definition of apoptosis in heart failure." *Heart failure reviews*. 2008; 13:121
- Aryal, Baikuntha, Jinsook Jeong, and V. Ashutosh Rao. "Doxorubicin-induced carbonylation and degradation of cardiac myosin binding protein C promote cardiotoxicity." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014; 111: 2011-2016
- Aggarwal, Parag, Jennifer B. Hall, Christopher B. McLeland, Marina A. Dobrovolskaia, and Scott E. McNeil. "Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy." *Advanced drug delivery reviews*. 2009; 61: 428-437
- Assemi S, Tadjiki S, Donose BC, Nguyen AV, Miller JD. "Aggregation of Fullerol C₆₀(OH)₂₄ Nanoparticles as Revealed Using Flow Field-Flow Fractionation and Atomic Force Microscopy." *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*. 2010; 26:16063-16070
- Ashley N, Poulton J. "Mitochondrial DNA is a direct target of anti-cancer anthracycline drugs." *Biochemical and biophysical research communications*. 2009; 378:450-455
- Baimanov, Didar, Rong Cai, and Chunying Chen. "Understanding the Chemical Nature of Nanoparticle-Protein Interactions." *Bioconjugate Chemistry*. 2019;
- Bally MB, Nayar R, Masin D, Cullis PR, Mayer LD. "Studies on the myelosuppressive activity of doxorubicin entrapped in liposomes." *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 1990; 27:13-9.
- Barenholz, YC. "Doxil®-the first FDA-approved nano-drug: lessons learned." *Journal of controlled release*. 2012; 160:117-134
- Barpe DR, Rosa DD, Froehlich PE. "Pharmacokinetic evaluation of doxorubicin plasma levels in normal and overweight patients with breast cancer and simulation of dose adjustment by different indexes of body mass." *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010; 41:458-63
- Barui, S, Saha S, Mondal G, Haseena S, Chaudhuri A. "Simultaneous delivery of doxorubicin and curcumin encapsulated in liposomes of pegylated RGDK-lipopeptide to tumor vasculature." *Biomaterials*. 2005; 35:1643-1656

- Bates, DA, Fung H, Mackillop WJ. "Adriamycin uptake, intracellular binding and cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells." *Cancer letters*. 1985; 28:213-221
- Bartoszek, A. "Metabolic activation of adriamycin by NADPH-cytochrome P450 reductase; overview of its biological and biochemical effects." *Acta biochimica polonica-english edition*. 2002; 49:323-332
- Bernhard, D, Laufer G. "The aging cardiomyocyte: a mini-review." *Gerontology*. 2008; 54:24-31
- Berthiaume, JM, Wallace KB. "Persistent alterations to the gene expression profile of the heart subsequent to chronic doxorubicin treatment." *Cardiovascular toxicology*. 2007; 7:178-191
- Bhat M, Robichaud N, Hulea L, Sonenberg N, Pelletier J, Topisirovic I. "Targeting the translation machinery in cancer." *Nature reviews Drug discovery*. 2015; 14:261-278
- Bhandari NR, Shewale AR, Kathe NJ, Shah AB, Painter JT. "Association Between The Use Of Doxorubicin And Risk Of Developing Hepatotoxicity Among Cancer Patients." *Value in Health*. 2016; 19:A134.
- Bianco A, Kostarelos K, Prato M. "Applications of carbon nanotubes in drug delivery." *Current opinion in chemical biology*. 2005; 9:674-679
- Blanco E, Shen H, Ferrari M. "Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery." *Nature biotechnology*. 2015; 33: 941-951
- Blanco JG, Leisenring WM, Gonzalez-Covarrubias VM, Kawashima TI, Davies SM, Relling MV, Robison LL, Sklar CA, Stovall M, Bhatia S. "Genetic polymorphisms in the carbonyl reductase 3 gene CBR3 and the NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 gene NQO1 in patients who developed anthracycline-related congestive heart failure after childhood cancer." *Cancer*. 2008; 112:2789-2795
- Blazkova I, Nguyen HV, Kominkova M, Konecna R, Chudobova D, Krejcova L, Kopel P et al. "Fullerene as a transporter for doxorubicin investigated by analytical methods and in vivo imaging." *Electrophoresis*. 2014; 35:1040-1049
- Bogdanović G, Vesna K, Djordjevic A, Čanadanović-Brunet J, Vojinović-Miloradov M, Baltić VV. "Modulating Activity of Fullerol C₆₀(OH)₂₂ on Doxorubicin-Induced Cytotoxicity." *Toxicology in Vitro*. 2004; 18:629–637

- Bogdanović V, Stankov K, Ičević I, et al. "Fullerenol C₆₀(OH)₂₄ effects on antioxidative enzymes activity in irradiated human erythroleukemia cell line." *J Radiat Res.* 2008; 49:321–327
- Borišev M, Borišev I, Župunski M, Arsenov D, Pajević S, Čurčić Ž, Vasin J, Djordjevic A. "Drought Impact Is Alleviated in Sugar Beets (*Beta vulgaris* L.) by Foliar Application of Fullerenol Nanoparticles." *PloS one.* 2016; 11: e0166248
- Borović ML, Ičević I, Kanački Z, Žikić D, Seke M, Injac R, Djordjević A. "Effects of Fullerenol C₆₀(OH)₂₄ Nanoparticles on a Single-dose Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in Pigs: An Ultrastructural Study." *Ultrastructural pathology.* 2014; 38:150-163
- Boucek RJ, Kunkel EM, Graham TP, Brenner D, Olson RD. "Doxorubicinol, The Metabolite Of Doxorubicin, Is More Cardiotoxic Than Doxorubicin." *Pediatric Research.* 1987; 21:187A-187A
- Brant JA, Labille J, Robichaud CO, Wiesner M. "Fullerol cluster formation in aqueous solutions: Implications for environmental release." *Journal of colloid and interface science.* 2007; 314 281-288
- Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, Wang ZV et al. "Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration." *International review of cell and molecular biology.* 2013; 301:215
- Brisebois PP, Arnold AA, Chabre YM, et al., 2012. "Comparative study of the interaction of fullerenol nanoparticles with eukaryotic and bacterial model membranes using solid-state NMR and FTIR spectroscopy." *European Biophysics Journal.* 41:535-544
- Bristow MR, Sageman WS, Scott RH, Billingham ME, Bowden RE, Kernoff RS, Snidow GH, Daniels JR. "Acute and chronic cardiovascular effects of doxorubicin in the dog: the cardiovascular pharmacology of drug-induced histamine release." *J Cardiovasc Pharmacol.* 1980; 2:487–515
- Broder H, Gottlieb RA, Lepor NE. "Chemotherapy and cardiotoxicity." *Rev Cardiovasc Med.* 2008; 9:75–83
- Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, Chen Q, Murakami M, Kimura M, Terada Y et al. "Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size." *Nature nanotechnology.* 2011; 6:815-823

- Cagel M, Grotz E, Bernabeu E, Moretton MA, Chiappetta DA. "Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside " *Drug discovery today*. 2017; 22: 270-281
- Camara AKS, Bienengraeber M, Stowe DF. "Mitochondrial approaches to protect against cardiac ischemia and reperfusion injury." *Frontiers in physiology*. 2011; 2:13
- Camaschella C. "Iron-deficiency anemia." *New England journal of medicine*. 2015; 372:1832-43.
- Camaschella, Clara, Antonella Nai, and Laura Silvestri. "Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era." *Haematologica*. 2020;
- Cataldo F, Da Ros T, editors. "Medicinal chemistry and pharmacological potential of fullerenes and carbon nanotubes." Springer Science & Business Media. 2008;
- Canzoneri JC, Oyelere AK. "Interaction of anthracyclines with iron responsive element mRNAs." *Nucleic acids research*. 2008; 36: 6825-6834
- Chaires JB, Herrera JE, Waring MJ. "Preferential binding of daunomycin to 5'ATCG and 5'ATGC sequences revealed by footprinting titration experiments." *Biochemistry*. 1990; 29:6145-6153
- Chaires JB, RF, Herrera KE, Britt M, Waring MJ. "Site and sequence specificity of the daunomycin-DNA interaction." *Biochemistry*. 1987; 26:8227-8236
- Chan S, Davidson N, Juozaityte E, Erdkamp F, Pluzanska A, Azarnia N, Lee LW. "Phase III trial of liposomal doxorubicin and cyclophosphamide compared with epirubicin and cyclophosphamide as first-line therapy for metastatic breast cancer." *Annals of Oncology*. 2004; 15:1527-1534
- Chang, Y-L, Lee H-J, Liu S-T, Lin Y-S, Chen T-C, Hsieh T-Y, Huang H-S, and Huang S-M. "Different roles of p53 in the regulation of DNA damage caused by 1, 2-heteroannelated anthraquinones and doxorubicin." *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2011; 43:1720-1728
- Chaudhuri P, Paraskar A, Soni S, Mashelkar RA, Sengupta S. "Fullerenol-cytotoxic conjugates for cancer chemotherapy. " *ACS Nano*. 2009; 3:2505-2514 a
- Chaudhuri P, Harfouche R, Soni S, Hentschel DM, Sengupta S. "Shape effect of carbon nanovectors on angiogenesis." *Acs Nano*. 2009; 4:574-582. b

- Chawla J, Arun K. "Management of Natural Resources in a Changing Environment. Chapter: Reducing the Toxicity of Carbon Nanotubes and Fullerenes Using Surface Modification Strategy. " 2014; 181-192
- Chen C, Cui J, Lu H, Wang R, Zhang S, Shen P. Modeling of the role of a Bax-activation switch in the mitochondrial apoptosis decision." *Biophysical Journal*. 2007; 92: 4304-4315
- Chen J, Rider DA, Ruan R. "Identification of valid housekeeping genes and antioxidant enzyme gene expression change in the aging rat liver." *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2006; 61: 20-27
- Chen M, Yin K, Zhang G, Liu H, Ning B, Dai Y, Wang X, Li H, Hao J. "Magnetic and Biocompatible Fullerenol/Fe (III) Microcapsules with Antioxidant Activities." *ACS Applied Bio Materials*. 2019; 3:358-68
- Chen TT, Li L, Chung DH, Allen CD, Torti SV, Torti FM, Cyster JG, Chen CY, Brodsky FM, Niemi EC, Nakamura MC. "TIM-2 is expressed on B cells and in liver and kidney and is a receptor for H-ferritin endocytosis." *The Journal of experimental medicine*. 2005; 202:955-65
- Chen Z. "Small-molecule delivery by nanoparticles for anticancer therapy." *Trends in molecular medicine*. 2010; 16:594-602
- Cheng LC, Jiang X, Wang J, Chen C, Liu RS. "Nano-bio effects: interaction of nanomaterials with cells." *Nanoscale*. 2013; 5:3547-3569
- Cheng R, Xue Y. "Carbon Nanomaterials for Drug Delivery. In *Carbon Nanomaterials for Biomedical Applications*." Springer International Publishing. 2016; 31-80
- Cheng S-H, Li F-C, Souris JS, Yang C-S, Tseng F-G, Lee H-S, Chen C-T, Dong C-Y, Lo L-W. "Visualizing dynamics of sub-hepatic distribution of nanoparticles using intravital multiphoton fluorescence microscopy." *ACS nano*. 2012; 6: 4122-4131
- Childs, April C., Sharon L. Phaneuf, Amie J. Dirks, Tracey Phillips, and Christiaan Leeuwenburgh. "Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2: Bax ratio." *Cancer research*. 2002; 62:4592-4598
- Chithrani BD, Chan WC. "Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes." *Nano Letters*. 2007; 7:1542-1550

- Choi GE, Kang MS, Kim YJ, Yoon JJ, Jeong YI. "Magnetically Responsive Drug Delivery Using Doxorubicin and Iron Oxide Nanoparticle-Incorporated Lipocomplexes." *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2019; 19:675-9
- Claycomb WC, Lanson NA, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ. "HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998; 95:2979-2984
- Coldwell KE, Cutts SM, Ognibene TJ, Henderson PT, Phillips DR. "Detection of Adriamycin-DNA adducts by accelerator mass spectrometry at clinically relevant Adriamycin concentrations." *Nucleic acids research*. 2008; 36: e100-e100
- Cooper, Chris E., Gayle R. Lynagh, Katharine P. Hoyes, Robert C. Hider, Richard Cammack, and John B. Porter. "The relationship of intracellular iron chelation to the inhibition and regeneration of human ribonucleotide reductase." *Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271:20291-20299
- Cullinane C, Cutts SM., Rosmalen A van, Phillips DR. "Formation of adriamycin-DNA adducts in vitro." *Nucleic acids research*. 1994; 22: 2296-2303
- Cutts SM, Nudelman A, Rephaeli R, Phillips DR. "The Power and Potential of Doxorubicin-DNA Adducts." *IUBMB Life*. 2005; 57:73–81
- Dai X, Yue Z, Eccleston ME, Swartling J, Slater NK, Kaminski CF. "Fluorescence Intensity and Lifetime Imaging of Free and Micellar-Encapsulated Doxorubicin in Living Cells." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2008; 4:49–56
- Dalen EC van, Michiels EM, Caron HN, et al. "Different anthracycline derivatives for reducing cardiotoxicity in cancer patients." *Cochrane Database Syst Rev* CD005006. 2010;
- Dalen EC van, Pal HJ van der, Caron HN, et al. " Different dosage schedules for reducing cardiotoxicity in cancer patients receiving anthracycline chemotherapy." *Cochrane Database Syst Rev* CD005008. 2009;
- Dalen EC van, HN Caron, HO Dickinson, et al."Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines." *Cochrane Database Syst Rev* CD003917. 2011;
- Damodar G, Smitha T, Gopinath S, Vijayakumar S, Rao YA. "An evaluation of hepatotoxicity in breast cancer patients receiving injection Doxorubicin." *Annals of medical and health sciences research*. 2014; 4:74-9

- Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF. "pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1983; 80:2258-62
- Deavall, Damian G., Elizabeth A. Martin, Judith M. Horner, and Ruth Roberts. "Drug-induced oxidative stress and toxicity." *Journal of toxicology*. 2012;
- Delpy E, Hatem SN, Andrieu N, Vaumas C de, Henaff M, Rücker-Martin C, Jaffrézou J-P, Laurent G, Levade T, Mercadier J-J. "Doxorubicin induces slow ceramide accumulation and late apoptosis in cultured adult rat ventricular myocytes." *Cardiovascular research*. 1999; 43:398-407
- Denard B, Lee C, Ye J. "Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1." *Elife*. 2012; 1:e00090
- Deng, Zhou J., Gysell Mortimer, Tara Schiller, Anthony Musumeci, Darren Martin, and Rodney F. Minchin. "Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles." *Nanotechnology*. 2009; 20: 455101
- Dent P. "The flip side of doxorubicin: Inflammatory and tumor promoting cytokines." *Cancer biology & therapy*. 2013;14:774-5
- Dixon SJ, Stockwell BR. "The role of iron and reactive oxygen species in cell death." *Nature chemical biology*. 2014; 10:9-17
- Dixon, Scott J., Kathryn M. Lemberg, Michael R. Lamprecht, Rachid Skouta, Eleina M. Zaitsev, Caroline E. Gleason, Darpan N. Patel et al. "Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death." *Cell*. 2012; 149:1060-1072
- Djordjevic A, Canadanovic-Brunet JM, Vojinovic-Miloradov M, Bogdanovic G." Antioxidant properties and hypothetic radical mechanism of fullereneol C₆₀(OH)₂₄." *Oxidation Communications*. 2004; 27:806-812
- Djordjevic A, Srdjenovic B, Seke M, Petrovic D, Injac R, Mrdjanovic M. "Review of synthesis and antioxidant potential of fullereneol nanoparticles." *Journal of Nanomaterials*. 2015; 16:280.
- Djordjevic A, Vojinović-Miloradov M, Petranović N, Devečerski A, Lazar D, Ribar B. "Catalytic preparation and characterization of C₆₀Br₂₄." *Fullerenes Sciences & Technology*. 1998; 6:689-694
- Djordjević A, Ajdinović B, Dopudj M, Trajković S, Milovanović Z, Maksin T, Nešković O, Bogdanović G, Trpkov Đ, Cvetičanin J, and Injac R. "Scintigraphy of the dog using

- [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]-C₆₀(OH)₂₂₋₂₄]." Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures. 2010; 6:99-106
- Dobrovolskaia MA et al. "Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution." Molecular pharmaceutics. 2008; 5:487-495
- Dong X, Mumper RJ. "Nanomedicinal strategies to treat multidrug-resistant tumors: current progress." Nanomedicine. 2010; 5:597-615.
- Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. Nature. 2000; 403:776-81
- Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, Andrews NC. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. Cell metabolism. 2005; 1:191-200
- Dorn GW, Maack C. "SR and mitochondria: calcium cross-talk between kissing cousins." Journal of molecular and cellular cardiology. 2013; 55: 42-49
- Doroshow JH. "Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinones." Proceedings of the National Academy of Sciences. 1986; 83:4514-4518
- Doroshow JH, Locker GY, Myers CE. "Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin." Journal of Clinical Investigation. 1980; 65:128
- Doroshow JH, Locker GY, Baldinger J, Myers CE. "The effect of doxorubicin on hepatic and cardiac glutathione." Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 1979; 26:285-295
- Doroshow JH. "Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart." Cancer Res. 1983; 43:460-472
- Dragojevic-Simic V, Jacevic V, Dobric S, Djordjevic A, Bokonjic D, Bajcetic M, Injac R. "Anti-inflammatory activity of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ nano-particles in a model of acute inflammation in rats." Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures. 2011;
- Dugan LL, Lovett EG, Quick KL, Lotharius J, Lin TT, O'Malley KL. "Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders. Parkinsonism & related disorders." 2001; 7:243-6

- Düssmann H, Rehm M, Concannon CG, Anguissola S, Würstle M, Kacmar S, Völler P, Huber HJ, Prehn JHM. "Single-cell quantification of Bax activation and mathematical modelling suggest pore formation on minimal mitochondrial Bax accumulation." *Cell Death & Differentiation*. 2010; 17:278-290
- Dorđević A, Bogdanović G. "Fullerenol: a new nanopharmaceutic?" *Archive of Oncology*. 2008; 16:42-5
- Ehrke MJ, Ryoyama K, Cohen SA. "Cellular basis for adriamycin-induced augmentation of cell-mediated cytotoxicity in culture." *Cancer research*. 1984; 44: 2497-2504
- El-Kareh AW, Secomb TW. "Two-mechanism peak concentration model for cellular pharmacodynamics of Doxorubicin." *Neoplasia*. 2005; 7:705-713
- El-Sayyad HI, Ismail MF, Shalaby FM, Abou-El-Magd RF, Gaur RL, Fernando A, Raj MH, Ouhtit A. "Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5-FU) on the liver of male albino rats." *International journal of biological sciences*. 2009; 5:466
- Engin, Ayse Basak, Dragana Nikitovic, Monica Neagu, Petra Henrich-Noack, Anca Oana Docea, Mikhail I. Shtilman, Kirill Golokhvast, and Aristidis M. Tsatsakis. "Mechanistic understanding of nanoparticles' interactions with extracellular matrix: the cell and immune system." *Particle and fibre toxicology*. 2017; 14:22
- Fan Y, Zhang Q. "Development of liposomal formulations: From concept to clinical investigations." *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; 8:81-87
- Fedier A, Schwarz VA, Walt H, Carpini RD, Haller U, Fink D. "Resistance to topoisomerase poisons due to loss of DNA mismatch repair." *International journal of cancer*. 2001; 93:571-6
- Ferris CD, Jaffrey SR, Sawa A, Takahashi M, Brady SD, Barrow RK, Tysoe SA, Wolosker H, Barañano DE, Doré S, Poss KD. Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nature cell biology*. 1999; 1:152-7
- Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, Dicker DJ, Chimed-Orchir O, Dandona R, Dandona L, Fleming T. "Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study." *JAMA oncology*. 2017; 3:524-48

- Foglesong PD, Reckord C, Swink S. "Doxorubicin inhibits human DNA topoisomerase I." *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 1992; 30:123-125
- Fonseca-Nunes, Ana, Paula Jakszyn, and Antonio Agudo. "Iron and cancer risk-a systematic review and meta-analysis of the epidemiological evidence." *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2013;
- Forbot N, Bolibok P, Wiśniewski M, Roszek K. "Carbonaceous Nanomaterials-Mediated Defense Against Oxidative Stress." *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2020; 20:294-307.
- Forrest RA, Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, Kimura K-I, Phillips DR, Cutts SM. "Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation." *Biochemical pharmacology*. 2012; 83:1602-1612
- Fröhlich, Eleonore. "The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles." *International journal of nanomedicine*. 2012; 7: 5577
- Fubini B, Ghiazza M, Fenoglio I. "Physico-Chemical Features of Engineered Nanoparticles Relevant to Their Toxicity." *Nanotoxicology*. 2010; 4:347-363
- Gao WD, Liu Y, Marban E. "Selective effects of oxygen free radicals on excitation-contraction coupling in ventricular muscle implications for the mechanism of stunned myocardium." *Circulation*. 1996; 94:2597-2604
- Gao Y, Yang H, Fan Y, Li L, Fang J, Yang W. "Hydrogen-rich saline attenuates cardiac and hepatic injury in doxorubicin rat model by inhibiting inflammation and apoptosis." *Mediators of inflammation*. 2016;
- Gelderman-Fuhrmann MP, Simakova O, Siddiqui SF, Vostal AC, Simak J. "Adverse Effects of Fullerenes on Endothelial Cells: Fullerenol C₆₀(OH)₂₄ Induced Tissue Factor and ICAM-1 Membrane Expression and Caused Apoptosis In Vitro." *Blood*. 2006; 108:1801-1801
- Geng H, Chang YN, Bai X, Liu S, Yuan Q, Gu W, Li J, Chen K, Xing G, Xing G. "Fullerenol nanoparticles suppress RANKL-induced osteoclastogenesis by inhibiting differentiation and maturation." *Nanoscale*. 2017; 9:12516-23
- Geng Y, Dalhaimer P, Cai S, Tsai R, Tewari M, Minko T, Discher DE. "Shape Effects of Filaments versus Spherical Particles in Flow and Drug Delivery." *Nat. Nanotechnol*. 2007; 2:249-255

- Gewirtz DA. "A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin." *Biochemical pharmacology*. 1999; 57:727-741
- Gille, Gabriele, and Heinz Reichmann. "Iron-dependent functions of mitochondria—relation to neurodegeneration." *Journal of neural transmission*. 2011; 118:349-359.
- Gil P, R. Durand FA, Iliadis A, Cano JP, Carcassonne Y. "Time dependency of adriamycin and adriamycinol kinetics." *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 1983; 10:120-124
- Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. "Regulation of iron transport and the role of transferrin." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2012; 1820:188-202
- Goormaghtigh, Erik, Pierre Chatelain, Jacques Caspers, and Jean Marie Ruyschaert. "Evidence of a specific complex between adriamycin and negatively-charged phospholipids." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1980; 597:1-14
- Goren D, Horowitz AT, Tzemach D, Tarshish M, Zalipsky S, Gabizon. A. "Nuclear Delivery of Doxorubicin via Folate-Targeted Liposomes with Bypass of Multidrug-Resistance Efflux Pump." *Clinical Cancer Research*. 2000; 6:1949–57
- Gracanin M, Davies MJ. "Inhibition of protein tyrosine phosphatases by amino acid, peptide, and protein hydroperoxides: potential modulation of cell signaling by protein oxidation products." *Free Radical Biology and Medicine*. 2007; 42:1543-1551
- Granado-Serrano AB, Martín MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. "Quercetin modulates Nrf2 and glutathione-related defenses in HepG2 cells: Involvement of p38." *Chemico-biological interactions*. 2012; 195:154-164
- Grebowski J, Kazmierska P, Krokosz A. "Fullerenols as a new therapeutic approach in nanomedicine." *BioMed research international*. 2013;
- Greene RF, Collins JM, Jenkins JF, Speyer JL, Myers CE. "Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol: implications for the design of in vitro experiments and treatment protocols." *Cancer research*. 1983; 43:3417-3421
- Grigorian A, O'Brien CB. "Hepatotoxicity secondary to chemotherapy." *Journal of clinical and translational hepatology*. 2014; 2:95.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. "Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter." *Nature*. 1997; 388:482-8

- Guenancia C, Li N, Hachet O, Rigal E, Cottin Y, Dutartre P, Rochette L, Vergely C. "Paradoxically, iron overload does not potentiate doxorubicin-induced cardiotoxicity in vitro in cardiomyocytes and in vivo in mice." *Toxicology and applied pharmacology*. 2015; 284:152-62
- Guo J, Cai W, Du B, Qian M, Sun Z. "Raman spectroscopic investigation on the interaction of malignant hepatocytes with doxorubicin." *Biophysical chemistry*. 2009; 140:57-61
- Gutteridge JM. "Lipid peroxidation and possible hydroxyl radical formation stimulated by the self-reduction of a doxorubicin-iron (III) complex." *Biochemical pharmacology*. 1984; 33:1725-8
- Haber, F. and J. Weiss. "Über die katalyse des hydroperoxydes." *Naturwissenschaften*. 1932; 20:948-950
- Haskill JS. "Adriamycin-activated macrophages as tumor growth inhibitors." *Cancer research*. 1981; 41:3852-3856
- He Y, Qin J, Wu S, Yang H, Wen H, Wang Y. "Cancer cell–nanomaterial interface: role of geometry and surface charge of nanocomposites in the capture efficiency and cell viability." *Biomaterials science*. 2019; 7:2759-68
- Heimann, Jessica, Lauren Morrow, Robin E. Anderson, and Andrew R. Barron. "Understanding the relative binding ability of hydroxyfullerene to divalent and trivalent metals." *Dalton Transactions*. 2015; 44: 4380-4388
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. "Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism." *Cell*. 2010; 142:24-38
- Hirai T, Yoshioka Y, Udaka A, Uemura E, Ohe T, Aoshima H, Gao J-Q, et al. "Potential Suppressive Effects of Two C₆₀ Fullerene Derivatives on Acquired Immunity." *Nanoscale research letters*. 2016; 11:449
- Hirsch A, Brettreich M. "Cluster modified fullerenes." *Fullerenes: Chemistry and Reactions*. 2005; 345-358
- Hovorka O, Št'astný M, Etrych T, Šubr V, Strohmalm J, Ulbrich K, Říhová B. "Differences in the intracellular fate of free and polymer-bound doxorubicin." *Journal of controlled release*. 2002; 80:101-117
- Hu Z, Huang Y, Guan W, Zhang J, Wang F, Zhao L. "The protective activities of water-soluble C₆₀ derivatives against nitric oxide-induced cytotoxicity in rat pheochromocytoma cells." *Biomaterials*. 2010; 31:8872-8881

- Hui R C-Y, Francis R.E, Guest SK, Costa JR, Gomes AR, Myatt SS; Brosens JJ, Lam EW-F. "Doxorubicin Activates FOXO3a to Induce the Expression of Multidrug Resistance Gene ABCB1 (MDR1) in K562 Leukemic Cells." *Molecular Cancer Therapeutics* 2008; 7:67078
- Ichikawa Y, Ghanefar M, Bayeva M, Wu R, Khechaduri A, Prasad SVN, R. Mutharasan K, Naik TJ, Ardehali H. "Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation." *The Journal of clinical investigation*. 2014; 124:617-630
- Ičević IĐ, Vukmirović SN, Srđenović BU, Suđi JJ, Đorđević AN, Injac RM, Vasović VM. "Protective effects of orally applied fullerene nanoparticles in rats after a single dose of doxorubicin." *Hemijska industrija*. 2011; 65:329-337
- Iijima S. "Helical microtubules of graphitic carbon." *Nature*. 1991; 354:56–58
- Ilinskaya AN, Dobrovolskaia MA. "Nanoparticles and the blood coagulation system. Part II: safety concerns." *Nanomedicine*. 2013; 8:969-981
- Isakovic A, Markovic Z, Todorovic-Markovic B, Nikolic N, Vranjes-Djuric S, Mirkovic M, et al. Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene. *Toxicology Sci*. 2006; 91:173-183
- Injac R, Boskovic M, Perse M, Koprivec-Furlan E, Cerar A, Djordjevic A, Strukelj B. "Acute doxorubicin nephrotoxicity in rats with malignant neoplasm can be successfully treated with fullereneol C₆₀(OH)₂₄ via suppression of oxidative stress." *Pharmacological Reports*. 2008; 60:742. a
- Injac R, Perse M, Cerne M, Potocnik N, Radic N, Govedarica B, Djordjevic A, Cerar A, Strukelj B. "Protective effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats with colorectal cancer." *Biomaterials*. 2009; 30:1184-1196 a
- Injac R, Perse M, Boskovic M, Djordjevic-Milic V, Djordjevic A, Hvala V, Cerar A, Strukelj B. "Cardioprotective effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ on a single dose doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with malignant neoplasm." *Technology in cancer research & treatment*. 2008; 7:15-25. b
- Injac R, Perse M, Obermajer N, Djordjevic-Milic V, Prijatelj M, Djordjevic A, Cerar A, Strukelj B. "Potential hepatoprotective effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ in doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats with mammary carcinomas." *Biomaterials*. 2008; 29:3451-3460. c

- Injac R, Radic N, Govedarica B, Perse M, Cerar A, Djordjevic A, Strukelj B. "Acute doxorubicin pulmototoxicity in rats with malignant neoplasm is effectively treated with fullereneol C₆₀(OH)₂₄ through inhibition of oxidative stress." *Pharmacological Reports*. 2009; 61:335-342 b
- Jacevic V, Djordjevic A, Srdjenovic B, Milic-Tores V, Segrt Z, Dragojevic-Simic V, Kuca K. "Fullereneol nanoparticles prevents doxorubicin-induced acute hepatotoxicity in rats." *Experimental and Molecular Pathology*. 2017; 102:360-369
- Jahangirian H, Kalantari K, Izadiyan Z, Rafiee-Moghaddam R, Shameli K, Webster TJ. "A review of small molecules and drug delivery applications using gold and iron nanoparticles." *International Journal of Nanomedicine*. 2019;14:1633.
- Javadov S, Kuznetsov A. "Mitochondrial permeability transition and cell death: the role of cyclophilin d." *Mitochondria: the cell powerhouse and nexus of stress*. 2014; 59
- Jensen AW, Wilson SR, Schuster DI. "Biological applications of fullerenes." *Bioorganic & medicinal chemistry*. 1996; 4:767-779.
- Ji ZQ, Sun H, Wang H, Xie Q, Liu Y, Wang Z. "Biodistribution and tumor uptake of C₆₀(OH)_x in mice." *Journal of Nanoparticle Research*. 2006; 8:53-63
- Jiang L, Gao Z, Ye L, Zhang A, Feng Z. "A tumor-targeting nano doxorubicin delivery system built from amphiphilic polyrotaxane-based block copolymers." *Polymer*. 2013; 54:5188-5198
- Jiang W, Kim BY, Rutka JT, Chan WC. "Nanoparticle-Mediated Cellular Response Is Size-Dependent." *Nature Nanotechnology*. 2008; 3:145-150
- Jiao F, Liu Y, Qu Y, Li W, Zhou G, Ge C, Li Y, Sun B, Chen C. "Studies on anti-tumor and antimetastatic activities of fullereneol in a mouse breast cancer model." *Carbon*. 2010; 48:2231-2243
- Jing L, Wang Y, Zhu Y, Oupický D. 2013. "Recent Advances in Delivery of Drug-Nucleic Acid Combinations for Cancer Treatment." *Journal of Controlled Release*. 2013; 172:589-600
- Johnson-Lyles DN, Peifley K, Lockett S, Neun BW, Hansen M, Clogston J, Stern ST, McNeil SE. "Fullereneol cytotoxicity in kidney cells is associated with cytoskeleton disruption, autophagic vacuole accumulation, and mitochondrial dysfunction." *Toxicology and applied pharmacology*. 2010; 248:249-258

- Jones PA, Baylin SB. "The fundamental role of epigenetic events in cancer." *Nature reviews genetics*. 2002; 3:415-428
- Jović D, Jačević V, Kuča K, Borišev I, Mrdjanovic J, Petrovic D, Seke M, Djordjevic A. "The Puzzling Potential of Carbon Nanomaterials: General Properties, Application, and Toxicity." *Nanomaterials*. 2020; 10:1508.
- Jović DS, Seke MN, Djordjevic AN, Mrđanović JŽ, Aleksić LD, Bogdanović GM, Pavić AB, Plavec J. "Fullerenol nanoparticles as a new delivery system for doxorubicin." *RSC Advances*. 2016; 6:38563-38578.
- Kahl R, Kampkötter A, Wätjen W, Chovolou Y. "Antioxidant enzymes and apoptosis." *Drug metabolism reviews*. 2004; 36:747-762
- Kajstura J, Rota M, Urbanek K, Hosoda T, Bearzi C, Anversa P, Bolli R, Leri A. "The telomere–telomerase axis and the heart." *Antioxidants & redox signaling*. 2006; 8:2125-2141
- Kalender Y, Yel M, Kalender S. "Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats: the effects of vitamin E and catechin." *Toxicology*. 2005; 209:39-45.
- Kalyanaraman B, Perez-Reyes E, Mason RP. "Spin-trapping and direct electron spin resonance investigations of the redox metabolism of quinone anticancer drugs." *Biochim Biophys Acta*. 1980; 630:119-130
- Kan L, Smith A, Chen M, Ledford BT, Fan H, Liu Z, He J-Q. "Rho-Associated Kinase Inhibitor (Y-27632) Attenuates Doxorubicin-Induced Apoptosis of Human Cardiac Stem Cells." *PloS one*. 2015;10:e0144513
- Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, VanBibber MM, Choi S-Y, de Groat WC, Peterson J. "Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001; 98:14126-14131
- Kang S-G, Zhou G, Yang P, Liu Y, Sun B, Huynh T, Meng H, et al. "Molecular mechanism of pancreatic tumor metastasis inhibition by Gd@C₈₂(OH)₂₂ and its implication for de novo design of nanomedicine." *Proceedings of the national academy of sciences*. 2012; 109:15431-15436

- Kassner N, Huse K, Martin H-J, Gödtel-Armbrust U, Metzger A, Meineke I, Brockmöller Jürgen, et al. "Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver." *Drug Metabolism and Disposition*. 2008; 36:2113-2120
- Kastan MB, Bartek J. "Cell-cycle checkpoints and cancer." *Nature*. 2004; 432:316-323
- Kawamura T, Hasegawa K, Morimoto T, Iwai-Kanai E, Miyamoto S, Kawase Y, Ono K, Wada H, Akao M, Kita T. "Expression of p300 protects cardiac myocytes from apoptosis in vivo." *Biochemical and biophysical research communications*. 2004; 315:733-738
- Kawase M, Watanabe M, Kondo T, Yabu T, Taguchi Y, Umehara H, Uchiyama T, Mizuno K, Okazaki T. "Increase of ceramide in adriamycin-induced HL-60 cell apoptosis: detection by a novel anti-ceramide antibody." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2002; 1584:104-114
- Keel SB, Doty RT, Yang Z, Quigley JG, Chen J, Knoblaugh S, Kingsley PD, De Domenico I, Vaughn MB, Kaplan J, Palis J. "A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science*." 2008; 319:825-8.
- Kobayashi S, Volden P, Timm D, Mao K, Xu X, Liang Q. "Transcription factor GATA4 inhibits doxorubicin-induced autophagy and cardiomyocyte death." *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285:793-804
- Kong L, Tedrow ON, Chan YF, Zepp RG. "VLight-initiated transformations of fullereneol in aqueous media." *Environmental science & technology*. 2009; 43:9155-9160.
- Koppenol, W. H. "The centennial of the Fenton reaction." *Free Radical Biology and Medicine*. 1993; 15: 645-651
- Kopečková V, Gentry C, Kopeček J. "Targetable HPMA copolymer-adriamycin conjugates. Recognition, internalization, and subcellular fate." *Journal of controlled release* 1998; 53:25-37
- Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Chaudhry Q. "A complementary definition of nanomaterial." *Nano Today*. 2010; 5:165-168
- Krishnan V, Rajasekaran AK. "Clinical nanomedicine: a solution to the chemotherapy conundrum in pediatric leukemia therapy." *Clin Pharmacol Ther*. 2014; 95:168-178
- Kroto HW, Heath JR, O'Brien SC, Curl RF, Smalley RE. "C₆₀: Buckminsterfullerene." *Nature*. 1985; 318:162-163

- Kumar R, Roy I, Ohulchanskyy TY, Vathy LA, Bergey EJ, Sajjad M, Prasad PN. "In vivo biodistribution and clearance studies using multimodal organically modified silica nanoparticles." *ACS nano*. 2010; 4:699-708
- Lao F, Chen L, Li W, et al. "Fullerene nanoparticles selectively enter oxidation-damaged cerebral microvessel endothelial cells and inhibit JNK-related apoptosis." *ACS Nano*. 2009; 3:3358-3368
- Lao F, Li W, Han D, et al. "Fullerene derivatives protect endothelial cells against NO-induced damage." *Nanotechnology*. 2009; 20:225103
- Lebedev AV, Levitsky DO, Loginov VA, et al. "The effect of primary products of lipid peroxidation on the transmembrane transport of calcium ions." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1982; 14:99-103.
- L'Ecuyer T, Sanjeev S, Thomas R, Novak R, Das L, Campbell W, Heide RV. "DNA damage is an early event in doxorubicin-induced cardiac myocyte death." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2006; 291:H1273-H1280;
- Lee M-S, Garrard WT. "Transcription-induced nucleosome'splitting': an underlying structure for DNase I sensitive chromatin." *The EMBO journal*. 1991; 10:607
- Lentacker I, Geers B, Demeester J, De Smedt SC, Sanders NN. "Design and Evaluation of Doxorubicin-Containing Microbubbles for Ultrasound-Triggered Doxorubicin Delivery: Cytotoxicity and Mechanisms Involved." *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 2010; 18:101-108
- Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA. "A clinicopathologic analysis of Adriamycin cardiotoxicity." *Cancer*. 1973; 32:302-314
- Leri A, Kajstura J, Anversa P. "Role of cardiac stem cells in cardiac pathophysiology: a paradigm shift in human myocardial biology." *Circulation research*. 2011; 109:941-961
- Li D-W, He H, Lin B-B, Xu Z-Q, Jiang F-L, Liu Y. "Studies on the isolated mitochondrial damage induced by α -tocopheryl succinate and its interactions with human serum albumin." *RSC Advances*. 2012; 4:3913-3919
- Li JY, Paragas N, Ned RM, Qiu A, Viltard M, Leete T, Drexler IR, Chen X, Sanna-Cherchi S, Mohammed F, Williams D. "Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery." *Developmental cell*. 2009; 16:35-46.

- Li, Timao, Igor Danelisen, Adriane Belló-Klein, and Pawan K. Singal. "Effects of probucol on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats." *Cardiovascular research*. 2000; 46: 523-530.
- Li Y, Luo HB, Zhang HY, Guo Q, Yao HC, Li JQ, Chang Q, et al. "Potential hepatoprotective effects of fullerol nanoparticles on alcohol-induced oxidative stress by ROS." *RSC Advances*. 2016; 6:31122-31130
- Liao LB, Zhou HY, Xiao XM. "Spectroscopic and viscosity study of doxorubicin interaction with DNA." *Journal of molecular structure*. 2005; 749:108-113
- Liang X-J, Chen C, Zhao Y, Wang PC. "Circumventing tumor resistance to chemotherapy by nanotechnology." *Multi-Drug Resistance in Cancer*. 2010; 467-488
- Licata S, Saponiero A, Mordente A, Minotti G. "Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction." *Chemical research in toxicology*. 2000; 13:414-420
- Lim J, Kim H, Alvarez PJ, Lee J, Choi W. "Visible Light Sensitized Production of Hydroxyl Radicals Using Fullerol as an Electron-Transfer Mediator." *Environmental Science & Technology*. 2016; 50:10545-53.
- Link G, Tirosh R, Pinson A, Hershko C. "Role of iron in the potentiation of anthracycline cardiotoxicity: identification of heart cell mitochondria as a major site of iron-anthracycline interaction." *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1996; 127:272-278
- Lipshultz SE, Rifai N, Dalton VM, Levy DE, Silverman LB, Lipsitz SR, Colan WSD, Asselin BL, Clavell LA, Hurwitz CA, Moghrabi RD, Samson Y, Schorin MA, Gelber RD, Sallan SE. "The effect of dexrazoxane on myocardial injury in doxorubicin-treated children with acute lymphoblastic leukemia." *N Engl J Med*. 2004; 351:145-153
- Liu J-H, Cao L, Luo PG, Yang ST, Lu F, Wang H, Meziani MJ et al. "Fullerene-conjugated doxorubicin in cells." *ACS applied materials & interfaces*. 2010; 2:1384-1389
- Liu J, Zheng H, Tang M, Ryu Y-C, Wang X. "A therapeutic dose of doxorubicin activates ubiquitin-proteasome system-mediated proteolysis by acting on both the ubiquitination apparatus and proteasome." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2008; 295:H2541-H2550

- Liu Yi, Jiao F, Qiu Y, Li W, Qu Y, Tian C, Li Yufeng, et al. "Immunostimulatory properties and enhanced TNF- α mediated cellular immunity for tumor therapy by C₆₀(OH)₂₀ nanoparticles." *Nanotechnology*. 2009; 20:415102
- Livak KJ, Schmittgen T. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method." *Methods*. 2001; 25:402-408.
- Lu LH, Lee YT, Chen HW, Chiang LY, Huang HC. "The possible mechanisms of the antiproliferative effect of fullereneol, polyhydroxylated C₆₀, on vascular smooth muscle cells." *British journal of pharmacology*. 1998; 123:1097-1102.
- Lucci A, Han T-Y, Liu Y-Y, Giuliano AE, Cabot MC. "Multidrug resistance modulators and doxorubicin synergize to elevate ceramide levels and elicit apoptosis in drug-resistant cancer cells." *Cancer*. 1999; 86:300-311
- Lukyanova NY, Rusetskya NV, Tregubova NA, Chekhun VF. "Molecular profile and cell cycle in MCF-7 cells resistant to cisplatin and doxorubicin." *Experimental Oncology*. 2009; 31:87-91
- Lüpertz R, Wätjen W, Kahl R, Chovolou Y. "Dose- and Time-Dependent Effects of Doxorubicin on Cytotoxicity, Cell Cycle and Apoptotic Cell Death in Human Colon Cancer Cells." *Toxicology* 2010; 271:115–121
- Ma P, Mumper RJ. "Anthracycline nano-delivery systems to overcome multiple drug resistance: A comprehensive review." *Nano Today* 2013; 8:313-331
- Maciel C, Fileti EE, Rivelino R. "Assessing the solvation mechanism of C₆₀(OH)₂₄ in aqueous solution." *Chemical Physics Letters*. 2011; 507:244-247
- Maccubbin DL, Wing KR, Mace KF, Ho RLX, Ehrke MJ, Mihich E. "Adriamycin-induced modulation of host defenses in tumor-bearing mice." *Cancer research*. 1992; 52:3572-3576
- Maejima Y, Adachi S, Ito H, Hirao K, Isobe M. "Induction of premature senescence in cardiomyocytes by doxorubicin as a novel mechanism of myocardial damage." *Aging cell*. 2008; 7:125-136
- Maksin T, Djokic D, Jankovic D, Djordjevic A, Neskovic O. "Comparison of some physico-chemical parameters and biological behaviour of fullereneol labelled with technetium-99m." *J Optoelectro Adv Mater*. 2007; 9:2571-2577

- Malka-Mahieu H, Newman M, Désaubry L, Robert C, Vagner S. "Molecular Pathways: The eIF4F Translation Initiation Complex-New Opportunities for Cancer Treatment." *Clinical Cancer Research*. 2017; 23:21-25
- Malugin A, Kopečková P, Kopeček J. "Liberation of doxorubicin from HPMA copolymer conjugate is essential for the induction of cell cycle arrest and nuclear fragmentation in ovarian carcinoma cells." *Journal of Controlled Release*. 2007; 124: 6-10
- Manivasagan P, Bharathiraja S, Bui NQ, Jang B, Oh YO, Lim IG, Oh J. "Doxorubicin-loaded fucoidan capped gold nanoparticles for drug delivery and photoacoustic imaging." *International journal of biological macromolecules*. 2016; 91:578-88.
- Manoli, Irini, Salvatore Alesci, Marc R. Blackman, Yan A. Su, Owen M. Rennert, and George P. Chrousos. "Mitochondria as key components of the stress response." *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2007; 18:190-198
- Mansouri E, Jangaran A, Ashtari A. "Protective effect of pravastatin on doxorubicin-induced hepatotoxicity." *Bratislavske lekarske listy*. 2017; 118:273-7.
- Markovic Z, Trajkovic V. "Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C₆₀)." *Biomaterials*. 2008; 29:3561-3573
- Marzenell, Paul, Helen Hagen, Leopold Sellner, Thorsten Zenz, Ruta Grinyte, Valeri Pavlov, Steffen Daum, and Andriy Mokhir. "Aminoferrocene-based prodrugs and their effects on human normal and cancer cells as well as bacterial cells." *Journal of medicinal chemistry*. 2013; 56: 6935-6944
- Mdlovu NV, Mavuso FA, Lin KS, Chang TW, Chen Y, Wang SS, Wu CM, Mdlovu NB, Lin YS. "Iron oxide-pluronic F127 polymer nanocomposites as carriers for a doxorubicin drug delivery system." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2019; 562:361-369
- Minko T, Kopečková P, Kopeček J. "Preliminary evaluation of caspases-dependent apoptosis signaling pathways of free and HPMA copolymer-bound doxorubicin in human ovarian carcinoma cells." *Journal of controlled release*. 2001; 71:227-237
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. "Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity." *Pharmacol Review*. 2004; 56:185-229
- Minotti, Giorgio, Raffaella Ronchi, Emanuela Salvatorelli, Pierantonio Menna, and Gaetano Cairo. "Doxorubicin irreversibly inactivates iron regulatory proteins 1 and 2 in

- cardiomyocytes: evidence for distinct metabolic pathways and implications for iron-mediated cardiotoxicity of antitumor therapy." *Cancer research*. 2001; 61:8422-8428
- Minotti, Giorgio, Stefania Recalcati, Alvaro Mordente, Giovanni Liberi, Antonio Maria Calafiore, Cesare Mancuso, Paolo Preziosi, and Gaetano Cairo. "The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium." *The FASEB journal*. 1998; 12:541-552
- Mirkov S, Djordjevic AN, Andric NL, Andric SA, Kostic TS, Bogdanovic GM, Vojinovic-Miloradov MB, Kovacevic RZ. "Nitric Oxide-Scavenging Activity of Polyhydroxylated Fullerenol, C₆₀(OH)₂₄" *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. 2004; 11:201-207
- Misirkic MS, Todorovic-Markovic BM, Vucicevic LM, et al. "The protection of cells from nitric oxide-mediated apoptotic death by mechanochemically synthesized fullerene (C₆₀) nanoparticles." *Biomaterials*. 2009; 30:2319-2328
- Misra R, Das M, Sahoo BS, Sahoo SK. "Reversal of multidrug resistance *in vitro* by co-delivery of MDR1 targeting siRNA and doxorubicin using a novel cationic poly (lactide-co-glycolide) nanoformulation." *International journal of pharmaceutics*. 2014; 475:372-384
- Mobaraki, M., A. Faraji, M. Zare, P. Dolati, M. Ataei, and HR Dehghan Manshadi. "Molecular mechanisms of cardiotoxicity: a review on major side-effect of doxorubicin." *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017; 79:335-344
- Moitra K. Overcoming multidrug resistance in cancer stem cells. *BioMed research international*. 2015; 2015.
- Monti E, Prosperi E, Supino R, Bottiroli G. "Free radical-dependent DNA lesions are involved in the delayed cardiotoxicity induced by Adriamycin in the rat." *Anticancer Research*. 1995; 15:193-197
- Monti M, Terzuoli E, Ziche M, Morbidelli L. "The sulphhydryl containing ACE inhibitor Zofenoprilat protects coronary endothelium from Doxorubicin-induced apoptosis." *Pharmacological research*. 2013; 76:171-181
- Morton SW, Lee MJ, Deng ZJ, Dreaden EC, Siouve E, Shopsowitz KE, Shah NJ, Yaffe MB, Hammond PT. "A nanoparticle-based combination chemotherapy delivery system for enhanced tumor killing by dynamic rewiring of signaling pathways." *Science signaling*. 2014; 7:ra44

- Moslen MT, Press CS. "Fullerenes. Synthesis, Properties, and Chemistry of Large Carbon Clusters." ACS Symposium. Series 481
- Moulin, Maryline, Jérôme Piquereau, Philippe Mateo, Dominique Fortin, Catherine Rucker-Martin, Mélanie Gressette, Florence Lefebvre et al. "Sexual dimorphism of doxorubicin-mediated cardiotoxicity: potential role of energy metabolism remodeling." *Circulation: Heart Failure*. 2015; 8:98-108
- Murugan MA, Gangadharan B, Mathur PP. "Antioxidative effect of fulleranol on goat epididymal spermatozoa." *Asian journal of andrology*. 2002; 4:149-52
- Myers C. "The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy." In *Seminars in oncology*. 1998; 25:10-14
- Myers CE, Gianni L, Simone CB, Klecker R, Greene R. "Oxidative destruction of erythrocyte ghost membranes catalyzed by the doxorubicin-iron complex." *Biochemistry*. 1982; 21:1707-1713
- Nagai K, Fukuno S, Oda A, Konishi H. "Protective effects of taurine on doxorubicin-induced acute hepatotoxicity through suppression of oxidative stress and apoptotic responses." *Anti-cancer drugs*. 2016; 27:17-23.
- Nagasaki, K., and S. Fleischer. "Modulation of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum by adriamycin and other drugs." *Cell calcium*. 1989; 10:63-70.
- Nakagawa Y, Suzuki T, Ishii H, Nakae D, Ogata A. "Cytotoxic effects of hydroxylated fullerenes on isolated rat hepatocytes via mitochondrial dysfunction." *Archives of toxicology*. 2011; 85:1429-1440
- Nakamura E, Isobe H. "Functionalized fullerenes in water. The first 10 years of their chemistry, biology, and nanoscience." *Accounts of chemical research*. 2003; 36:807-815.
- Nedumpully Govindan P, Monticelli L, Salonen E. "Mechanism of taq DNA polymerase inhibition by fullerene derivatives: insight from computer simulations." *The Journal of Physical Chemistry B*. 2012; 116:10676-10683.
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. "Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization." *Science*. 2004; 306:2090-3

- Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T. "A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes." *Cancer cell*. 2006; 10: 515-27
- Nielsen, G. D., Roursgaard, M.; Jensen, K. A.; Poulsen, S. S.; Larsen, S. T. "In Vivo Biology and Toxicology of Fullerenes and Their Derivatives." *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2008; 103: 197-208
- Noeman SA, Hamooda HE, Baalash AA. "Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats." *Diabetology & metabolic syndrome*. 2011; 3:1
- Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, Jiang D, Zhang Y, Dubonos SV, et al. "Electric field effect in atomically thin carbon films." *Science*. 2004; 306: 666–669
- Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. "Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies." *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2012; 52:1213-1225 a
- Octavia Y, Rocca HPB, Moens AL. "NADPH oxidase-dependent oxidative stress in the failing heart: from pathogenic roles to therapeutic approach." *Free Radical Biology and Medicine*. 2012; 52: 291-297 b
- Ohgami RS, Campagna DR, McDonald A, Fleming MD. "The Steap proteins are metalloreductases." *Blood*. 2006; 108:1388-94.
- Olson RD, MacDonald JS, van Boxtel CJ, Boerth RC, Harbison RD, Slonim AE, Freeman RW, Oates JA. "Regulatory role of glutathione and soluble sulfhydryl groups in the toxicity of Adriamycin." *J Exp Ther*. 1980; 215:450-454
- Olson RD, Mushlin PS, Brenner DE, Fleischer S, Cusack BJ, Chang BK, Boucek RJ. "Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988; 85:3585-3589
- Omelyanenko V, Kopečková P, Gentry C, Kopeček J. "Targetable HPMA copolymer-adriamycin conjugates. Recognition, internalization, and subcellular fate." *Journal of controlled release*. 1998; 53:25-37
- Pan ST, Li ZL, He ZX, Qiu JX, Zhou SF. "Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2016; 43:723-37

- Pang B, Qiao X, Janssen L, Velds A, Groothuis T, Kerkhoven R, Nieuwland M et al. "Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin." *Nature communications*. 2013; 4:1908
- Park A-M, Nagase H, Liu L, Kumar SV, Szwergold N, Wong C-M, Suzuki YJ. "Mechanism of anthracycline-mediated down-regulation of GATA4 in the heart." *Cardiovascular research*. 2010; cvq361
- Park EJ, Kwon HK, Choi ZM, Shin HJ, Choi S. "Doxorubicin Induces Cytotoxicity through Upregulation of pERK-Dependent ATF3. *PLoS ONE*. 2012; 7:e44990
- Parker, Margaret A., Valencia King, and Kathleen P. Howard. "Nuclear magnetic resonance study of doxorubicin binding to cardiolipin containing magnetically oriented phospholipid bilayers." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2001; 1514:206-216
- Parveen A, et al. "Silica nanoparticles mediated neuronal cell death in corpus striatum of rat brain: implication of mitochondrial, endoplasmic reticulum and oxidative stress." *Journal of Nanoparticle Research*. 2014; 16:1-15
- Pedrycz A, Wieczorski M, Czerny K. "The influence of a single dose of adriamycin on the pregnant rat female liver-histological and histochemical evaluation. In *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska*." Sectio D: Medicina. 2003; 59:319-323
- Peslova G, Petrak J, Kuzelova K, Hrdy I, Halada P, Kuchel PW, Soe-Lin S, Ponka P, Sutak R, Becker E, Huang ML. "Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to α -2-macroglobulin in blood." *Blood*. 2009; 113:6225-36
- Petrak J, Vyoral D. "Hephaestin - a ferroxidase of cellular iron export." *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2005; 37:1173-8
- Petrovic D, Seke M, Borovic ML, Jovic D, Borisev I, Srdjenovic B, Rakocevic Z, Pavlovic V, Djordjevic A. "Hepatoprotective effect of fullereneol/doxorubicin nanocomposite in acute treatment of healthy rats." *Experimental and molecular pathology*. 2018; 104:199-211
- Petrovic D, Seke M, Srdjenovic B, Djordjevic A. "Applications of anti/prooxidant fullerenes in nanomedicine along with fullerenes influence on the immune system." *Journal of Nanomaterials*. 2015; 16:279

- Philpott CC, Ryu MS, Frey A, Patel S. "Cytosolic iron chaperones: proteins delivering iron cofactors in the cytosol of mammalian cells." *Journal of Biological Chemistry*. 2017; 292:12764-71
- Piątek A, Dawid A, Gburski Z. "The properties of small fulleranol cluster (C₆₀(OH)₂₄)₇: computer simulation." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2011; 79:819-823
- Pickering KD, Wiesner MR. "Fullerol-sensitized production of reactive oxygen species in aqueous solution." *Environmental science & technology*. 2005; 39:1359-1365
- Piegari E, Angelis AD, Cappetta D, Russo R, Esposito G, Costantino S, Graiani G et al. "Doxorubicin induces senescence and impairs function of human cardiac progenitor cells." *Basic research in cardiology*. 2013; 108:334
- Pietrangelo A. "Iron and the liver." *Liver international*. 2016; 36:116-23
- Poelstra K, Prakash J, Beljaars L. "Drug targeting to the diseased liver." *Journal of controlled release*. 2012; 161:188-197
- Poizat C, Puri PL, Bai Y, Kedes L. "Phosphorylation-dependent degradation of p300 by doxorubicin-activated p38 mitogen-activated protein kinase in cardiac cells." *Molecular and cellular biology*. 2005; 25:2673-2687
- Prat, Aleix, Joel S. Parker, Olga Karginova, Cheng Fan, Chad Livasy, Jason I. Herschkowitz, Xiaping He, and Charles M. Perou. "Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer." *Breast cancer research*. 2010; 12: R68.
- Qiao R, Roberts AP, Mount AS, Klaine SJ, Ke PC. "Translocation of C₆₀ and its derivatives across a lipid bilayer." *Nano Letters*. 2007; 7:614-619
- Qingnuan Li, Xiaodong Z, Ruili L, Xiaoguang S, Shaoliang C, Wenxin L. "Preparation of 99m Tc-C₆₀(OH)_x and its biodistribution studies." *Nuclear medicine and biology*. 2002; 29: 707-710
- Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, Sandoval C, Zhao R, Akabas MH, Goldman ID. "Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption." *Cell*. 2006; 127:917-28
- Radomski A, Jurasz P, Alonso-Escolano D, Drews M, Morandi M, Malinski T, Radomski MW. "Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis." *British journal of pharmacology*. 2005; 146:882-893

- Rajagopal A, Rao AU, Amigo J, Tian M, Upadhyay SK, Hall C, Uhm S, Mathew MK, Fleming MD, Paw BH, Krause M. "Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins." *Nature*. 2008; 453:1127-1131
- Rakusan K, Cicutti N, Flanagan MF. "Changes in the microvascular network during cardiac growth, development, and aging." *Cellular & molecular biology research*. 1993; 40:117-122
- Ratnikova TA, Nedumpully Govindan P, Salonen E, et al. "In vitro polymerization of microtubules with a fullerene derivative." *ACS nano*. 2011; 5:6306-6314
- Rauscher H, Sokull-Klüttgen B, Stamm H. "The European Commission's recommendation on the definition of nanomaterial makes an impact." *Nanotoxicology*. 2012; 7:1195-1197
- Reeve JL, Szegezdi E, Logue SE, Chonghaile TN, O'Brien T, Ritter T, Samali A. "Distinct Mechanisms of Cardiomyocyte Apoptosis Induced by Doxorubicin and Hypoxia Converge on Mitochondria and Are Inhibited by Bcl-xL." *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2007; 11: 09-20
- Rivankar S. "An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy." *Journal of cancer research and therapeutics*. 2014; 10:853
- Rizwan A, Rasheed Z, Ahsan H. "Biochemical and cellular toxicology of peroxy nitrite: implications in cell death and autoimmune phenomenon." *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 2009; 31:388-396
- Robles AI, Wang XW, Harris CC. "Drug-induced apoptosis is delayed and reduced in XPD lymphoblastoid cell lines: possible role of TFIIH in p53-mediated apoptotic cell death." *Oncogene*. 1999; 18:4681-4688
- Rochette L, Tatou E, Maupoil V, Zeller M, Cottin Y, Jazayeri S, Brenot R, Girard C, David M, Vergely C. "Atrial and vascular oxidative stress in patients with heart failure." *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2011; 27:497-502
- Rodríguez-Ramiro I, Ramos S, Bravo L, Goya L, Martín MA. "Procyanidin B2 induces Nrf2 translocation and glutathione S-transferase P1 expression via ERKs and p38-MAPK pathways and protect human colonic cells against oxidative stress." *European journal of nutrition*. 2012; 51:881-892
- Rokitskaya TI, Antonenko YN "Fullerenol C₆₀(OH)₂₄ increases ion permeability of lipid membranes in a pH-dependent manner." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*. 2016; 1858:1165-1174

- Ron D, Walter P. "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007; 8:519-529
- Rosenberg SA. "Decade in review - cancer immunotherapy: Entering the mainstream of cancer treatment. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2014; 11:630-632.
- Roursgaard M, Poulsen SS, Iohara, Daisuke, Yoshitaka Umezaki, Makoto Anraku, Kaneto Uekama, and Fumitoshi Hirayama. "In Vitro and In Vivo Evaluation of Hydrophilic C₆₀(OH)₁₀/2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin Nanoparticles as an Antioxidant." *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016; 105:2959-2965
- Roursgaard M, Poulsen SS, Kepley CL, Hammer M, Nielsen GD, Larsen ST. "Polyhydroxylated C₆₀ fullerene (fullerenol) attenuates neutrophilic lung inflammation in mice. " *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008; 103:386-388
- Ruibin L, Wu R, Zhao L, Wu M, Yang L, Zou H. "P-Glycoprotein Antibody Functionalized Carbon Nanotube Overcomes the Multidrug Resistance of Human Leukemia Cells." *ACS Nano*. 2010; 4:1399-1408
- Rusetskaya NV, Lukyanova NZ, Chekhun VF. "Molecular Profile and Cell Cycle in MCF-7 and MCF-7/Dox Cells Exposed to Conventional and Liposomal Forms of Doxorubicin. " *Experimental Oncology*. 2009; 31:140-43
- Sachkova AS, Kovel ES, Churilov GN, Guseynov OA, Bondar AA, Dubinina IA, Kudryasheva NS. "On mechanism of antioxidant effect of fullerenols." *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2017; 9:1-8
- Samuni, A., P. LG Chong, Y. Barenholz, and T. E. Thompson. "Physical and chemical modifications of adriamycin: iron complex by phospholipid bilayers." *Cancer research*. 1986; 46:594-599
- Santos SM., Dinis AM, Peixoto F, Ferreira L, Jurado AS, Videira RA. "Interaction of fullerene nanoparticles with biomembranes: from the partition in lipid membranes to effects on mitochondrial bioenergetics." *Toxicological sciences*. 2013; kft327
- Sayes CM, Fortner JD, Guo W, Lyon D, Boyd AM, Ausman KD, et al. "The differential cytotoxicity of water soluble fullerenes. " *Nano Letters*. 2004; 4:1881-1887
- Seke M, Petrovic D, Djordjevic A, Jovic D, Borovic ML, Kanacki Z, Jankovic M. "Fullerenol/doxorubicin nanocomposite mitigates acute oxidative stress and modulates apoptosis in myocardial tissue. *Nanotechnology*." 2016; 27:485101

- Semenov KN, Charykov NA, Keskinov VN. "Fullerenol synthesis and identification. Properties of the fullerenol water solutions." *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2011; 56:230-239
- Senchenkov A, Litvak DA, Cabot MC. "Targeting ceramide metabolism-a strategy for overcoming drug resistance." *Journal of the National Cancer Institute*. 2001; 93:347-357
- Seynhaeve ALB, Dicheva BM, Hoving S, Koning GA, Ten Hagen TL. "Intact Doxil Is Taken up Intracellularly and Released Doxorubicin Sequesters in the Lysosome: Evaluated by in Vitro/in Vivo Live Cell Imaging." *Journal of Controlled Release*. 2013; 172: 330-340
- Singla S, Kumar NR, Kaur J. "In vivo studies on the protective effect of propolis on doxorubicin-induced toxicity in liver of male rats." *Toxicology international*. 2014; 21:191
- Slavic M, Djordjevic A, Radojicic R, Milovanovic S, Orescanin-Dusic Z, Rakocevic Z, Spasic MB, Blagojevic D. "Fullerenol C₆₀(OH)₂₄ nanoparticles decrease relaxing effects of dimethyl sulfoxide on rat uterus spontaneous contraction." *Journal of nanoparticle research*. 2013; 15:1650
- Schütz CA, Juillerat-Jeanneret L, Mueller H, Lynch I, Riediker M. "Therapeutic nanoparticles in clinics and under clinical evaluation." *Nanomedicine*. 2013; 8:449-467
- Shaikh F, Dupuis LL, Alexander S, Gupta A, Mertens L, Nathan PC. "Cardioprotection and second malignant neoplasms associated with dexrazoxane in children receiving anthracycline chemotherapy: a systematic review and meta-analysis." *Journal of the National Cancer Institute*. 2016; 108: djv357
- Shalviri A, Raval G, Prasad P, Chan C, Liu Q, Heerklotz H, Rauth MA, Wu XY. "pH-Dependent doxorubicin release from terpolymer of starch, polymethacrylic acid and polysorbate 80 nanoparticles for overcoming multi-drug resistance in human breast cancer cells." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2012; 82:587-597
- Shen Q, Qiu L. "Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by doxorubicin and quinine co-loaded liposomes in tumor cells." *Journal of Liposome Research*. 2016; 1-9
- Singal PK, Deally CM, Weinberg LE. "Subcellular effects of Adriamycin in the heart: a concise review." *J Mol Cell Cardiol*. 1987; 19:817-828

- Singal PK, Segstro RJ, Singh RP, Kutryk MJ. "Changes in lysosomal morphology and enzyme activities during the development of Adriamycin-induced cardiomyopathy." *Can J Cardiol.* 1985;1:139-147
- Soares MP, H Soares MP, Hamza I. "Macrophages and iron metabolism." *Immunity.* 2016; 15; 44:492-504
- Sokolov VS, Churakova TD, Bulgakov VG et al. "Study of action mechanisms of the products of lipid peroxide oxidation on permeability of bilayer lipid-membranes." *Biofizika.* 1981; 26:147-149
- Souris JS, Lee C-H, Cheng S-H, Chen C-T, Yang C-S, Ho Ja-an A, Mou C-Y, Lo L-W. "Surface charge-mediated rapid hepatobiliary excretion of mesoporous silica nanoparticles." *Biomaterials.* 2010; 31: 5564-5574
- Stankov K, Borisev I, Kojic V, Rutonjski L, Bogdanovic G, Djordjevic A. "Modification of antioxidative and antiapoptotic genes expression in irradiated K562 cells upon fullereneol C₆₀(OH)₂₂ nanoparticle treatment. " *J Nanosci Nanotechnol.* 2013; 13:105-113
- Sugino N, Telleria CM, Gibori G. "Differential regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in the rat corpus luteum: induction of manganese superoxide dismutase messenger ribonucleic acid by inflammatory cytokines." *Biology of reproduction.* 1998; 59:208-215
- Sun C, Wang L, Gao D, Pan Y, Zhao Y, Chen C, Guo M. "C₆₀(OH)₂₂: a potential histone deacetylase inhibitor with anti-angiogenic activity." *Nanoscale.* 2016; 36:16332-16339
- Suwei WANG, Kotamraju S, Konorev E, Kalivendi S, Joseph J, Kalyanaraman B. "Activation of nuclear factor-κB during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is pro-apoptotic: the role of hydrogen peroxide." *Biochemical Journal.* 2002; 367:729-740
- Swain SM, Vici P. "The current and future role of dexrazoxane as a cardioprotectant in anthracycline treatment: expert panel review." *Journal of cancer research and clinical oncology.* 2004; 130:1-7
- Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. "Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin. A retrospective analysis of three trials. " *Cancer.* 2003; 97:2869-2879
- Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, Phillips DR, Cutts SM. "Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death." *Cancer research.* 2006; 66:4863-4871

- Šimunek T, Šterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R, Geršl V. "Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron." *Pharmacological Reports*. 2009; 61:154-71
- Ta, Hang T., Zhen Li, Christoph E. Hagemeyer, Gary Cowin, Shaohua Zhang, JathushanPalasubramaniam, Karen Alt, Xiaowei Wang, Karlheinz Peter, and Andrew K. Whittaker. "Molecular imaging of activated platelets via antibody-targeted ultra-small iron oxide nanoparticles displaying unique dual MRI contrast." *Biomaterials*. 2017; 13431-13442
- Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. "Doxorubicin: An Update on Anticancer Molecular Action, Toxicity and Novel Drug Delivery Systems." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013; 65:157-170
- Tagmatarchis N, Shinohara H. "Fullerenes in medicinal chemistry and their biological applications." *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2001; 1:339-348
- Taherian A, Mazoochi T. "Different expression of extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 and phospho-Erk proteins in MBA-MB-231 and MCF-7 Cells after chemotherapy with doxorubicin or docetaxel." *Iranian journal of basic medical sciences*. 2012; 15:669
- Takemura G, Fujiwara H. "Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management." *Prog Cardiovasc Dis*. 2007; 49:330-352
- Tang J, Zhang R, Guo M, Shao L, Liu Y, Zhao Y, Zhang S, Wu Y, Chen C. "Nucleosome-inspired nanocarrier obtains encapsulation efficiency enhancement and side effects reduction in chemotherapy by using fullereneol assembled with doxorubicin." *Biomaterials*. 2018; 167:205-15
- Terman A, Brunk UT. "Autophagy in cardiac myocyte homeostasis, aging, and pathology." *Cardiovascular research*. 2005; 68:355-365
- Terman A, Kurz T, Gustafsson B, Brunk UT. "The involvement of lysosomes in myocardial aging and disease." *Current cardiology reviews*. 2008; 4:107-115
- Terman A, Kurz T, Navratil M, Arriaga EA, Brunk UT. "Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging." *Antioxidants & redox signaling*. 2010; 12:503-535
- Thorn C, Oshiro FC, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB. "Doxorubicin Pathways: Pharmacodynamics and Adverse Effects." *Pharmacogenetics and Genomics*. 2011; 21:440-46

- Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, Liu LF. "Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II." *Science*. 1984; 226: 466-468
- Thiel, Elizabeth C., Gunther L. Eichhorn, and Luigi G. Marzilli. "Iron binding proteins without cofactors or sulfur clusters." 1983;
- Thilgen C, Diederich F. "The higher fullerenes: covalent chemistry and chirality. In *Fullerenes and Related Structures*." Springer. 1999; 135-171
- Tong J, Ganguly PK, Singal PK. "Myocardial adrenergic changes at two stages of heart failure due to Adriamycin treatment in rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1991; 260:H909-H916
- Torti, Suzy V., and Frank M. Torti. "Iron and cancer: more ore to be mined." *Nature reviews Cancer*. 2013; 13:342
- Trajković S, Dobrić S, Jačević V, Dragojević-Simić V, Milovanović Z, Đorđević A. "Tissue-protective effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ and amifostine in irradiated rats." *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 2007; 58:39-43.
- Tu Y, Xu FH, Liu J, Vescio R, Berenson J, Fady C, Lichtenstein A. "Upregulated expression of BCL-2 in multiple myeloma cells induced by exposure to doxorubicin, etoposide, and hydrogen peroxide." *Blood*. 1996; 88:1805-1812
- Ueng T-H, Kang JJ, Wang H-W, Cheng Y-W, Chiang LY. "Suppression of microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases and mitochondrial oxidative phosphorylation by fullereneol, a polyhydroxylated fullerene C₆₀." *Toxicology letters*. 1997; 93:29-37
- Upadhyay D, Wei WCK, Gao M, Rosen GD. "Fibroblast growth factor-10 prevents H₂O₂-induced cell cycle arrest by regulation of G1 cyclins and cyclin dependent kinases." *FEBS letters*. 2007; 581:248-252
- Upadhyay KK, Bhatt AN, Mishra AK, Dwarakanath BS, Jain S, Schatz C, Le Meins JF, et al. "The Intracellular Drug Delivery and Anti Tumor Activity of Doxorubicin Loaded Poly(γ -Benzyl L-Glutamate)-B-Hyaluronan Polymersomes." *Biomaterials*. 2010; 31:1882–1892
- Van R, Cullinane AC, Cutts SM, Phillips DR. "Stability of adriamycin-induced DNA adducts and interstrand crosslinks." *Nucleic acids research*. 1995; 3:42-50

- Varga ZV, Ferdinandy P, Liaudet L, Pacher P. "Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2015; 309: H1453-H1467
- Vasilevskaya I, O'Dwyer PJ. "Role of Jun and Jun kinase in resistance of cancer cells to therapy." *Drug resistance updates*. 2003; 6:147-156
- Vatansver F, Chandran R, Sadasivam M, Chiang LY, Hamblin MR. "Multi-Functionality in Theranostic Nanoparticles: is more Always Better?" *J Nanomed Nanotechnol*. 2012; 3:120
- Vileno B, Marcoux PR, Lekka M, Sienkiewicz A, Fehér T, Forró L. "Spectroscopic and Photophysical Properties of a Highly Derivatized C₆₀ Fullerol." *Advanced Functional Materials*. 2006; 16:120–128
- Vileno B, Sienkiewicz A, Lekka M, Kulik JA, Forro L. "In vitro assay of singlet oxygen generation in the presence of water-soluble derivatives of C₆₀." *Carbon*. 2004; 42: 1195–1198
- Vo N, Goodman RH. "CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation." *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276:13505-13508
- Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, Davis HL, Jr, Von Hoff AL, Rozencweig M, Muggia FM. "Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure." *Ann Intern Med*. 1979; 01:710-717
- Vraneš M, Borišev I, Tot A, Armaković S, Armaković S, Jović D, Gadžurić S, Djordjevic A. "Self-assembling, reactivity and molecular dynamics of fullereneol nanoparticles." *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2017; 19:135-144.
- Wallace KB. "Adriamycin-induced interference with cardiac mitochondrial calcium homeostasis." *Cardiovascular toxicology*. 2007; 7:101-107
- Wang G-X, Wang Y-X, Zhou X-B, Korth M. "Effects of doxorubicinol on excitation-contraction coupling in guinea pig ventricular myocytes." *European journal of pharmacology*. 2001; 423:99-107
- Wang H, Thorling CA, Liang X, Bridle KR, Grice JE, Zhu Y, Crawford DHG, Xu ZP, Liu X, Roberts MS. "Diagnostic imaging and therapeutic application of nanoparticles targeting the liver." *Journal of Materials Chemistry B*. 2015; 3:939-958

- Wang, Zhenzhen, Xingfa Gao, and Yuliang Zhao. "Mechanisms of Antioxidant Activities of Fullerenols from First-Principles Calculation." *The Journal of Physical Chemistry A*. 2018; 122: 8183-8190
- Weiss RB. "The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?." In *Seminars in oncology*. 1992; 19:670-686.
- Wen J, You KR, Lee SY, et al. "Oxidative stress-mediated apoptosis the anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide." *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277:38954-38964
- Wilson LJ, Cagle DW, Thrash TP, Kennel SJ, Mirzadeh S, Alford JM, Ehrhardt GJ. Metallofullerene drug design. *Coordination chemistry reviews*. 1999; 190:199-207
- Wilson SR. "The potential of fullerene compounds in biology and medicine." *Proc. Electrochem. Soc*. 1997; 97-42.
- Wu, KC, McDonald PR, Liu JJ, Chaguturu R, Klaassen CD. "Implementation of a high-throughput screen for identifying small molecules to activate the Keap1-Nrf2-ARE pathway." *PLoS One* 2012; 7: e44686
- Xu L, Liu Y, Chen Z, Li W, Liu Y, Wang L, Ma L, Shao Y, Zhao Y, Chen C. "Morphologically virus-like fullerene nanoparticles act as the dual-functional nanoadjuvant for HIV-1 vaccine. *Advanced Materials*." 2013; 25:5928-36
- Yagmurca M, Bas O, Mollaoglu H, Sahin O, Nacar A, Karaman O, Songur A. "Protective effects of erdosteine on doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats." *Archives of medical research*. 2007; 38:380-385.
- Yang F, Kemp CJ, Henikoff S. "Doxorubicin enhances nucleosome turnover around promoters." *Current Biology*. 2013; 23:782-787
- Yang L-Y, Gao J-L, GaoT, DongP, Ma L, Jiang F-L, Liu Y. "Toxicity of polyhydroxylated fullerene to mitochondria." *Journal of hazardous materials*. 2016; 301:119-126
- Yang XL, Fan CH, Zhu HS. "Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C60] fullerene derivatives and its mechanism." *Toxicology in vitro*. 2002; 16:41-46
- Yang Y, Yuan S-X, Zhao L-H, Wang C, Ni J-S, Wang Z-G, Lin C, Wu M-C, Zhou W-P. "Ligand-directed stearic acid grafted chitosan micelles to increase therapeutic efficacy in hepatic cancer." *Molecular pharmaceutics*. 2015; 12:644-652
- Ye S, Chen M, Jiang Y, Chen M, Zhou T, Wang Y, Hou Z, Ren L. "Polyhydroxylated fullerene attenuates oxidative stress-induced apoptosis via a fortifying Nrf2-regulated

- cellular antioxidant defence system." *International journal of nanomedicine*. 2014; 9:2073
- Ye S, Marston G, McLaughlan GR, Sigle DO, Ingram N, Freear S, Baumberg JJ et al. "Engineering Gold Nanotubes with Controlled Length and Near-Infrared Absorption for Theranostic Applications." *Advanced Functional Materials*. 2015; 25: 2117-2127
- Yi X, Bekeredjian R, DeFilippis NJ, Siddiquee Z, Fernandez E, Shohet RV. "Transcriptional analysis of doxorubicin-induced cardiotoxicity." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2006; 290:H1098-H1102
- Yin JJ, Lao F, Fu PP, Wamer WG, Zhao Y, Wang PC, Qiu Y, Sun B, Xing G, Dong J, Liang XJ, Chen C. The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials. *Biomaterials*. 2009; 30:611-621
- Yokochi T, Robertson KD. "Doxorubicin inhibits DNMT1, resulting in conditional apoptosis." *Molecular pharmacology*. 2004; 66:1415-1420
- Yousefpour P, Atyabi F, Vasheghani-Farahani E, Movahedi AA, Dinarvand R. "Targeted delivery of doxorubicin-utilizing chitosan nanoparticles surface-functionalized with anti-Her2 trastuzumab." *Int J Nanomedicine*. 2011; 6:1977-1990
- Yu P, Yu H, Guo C, Cui Z, Chen X, Yin Q, Zhang P, Yang X, Cui H, Li Y. "Reversal of doxorubicin resistance in breast cancer by mitochondria-targeted pH-responsive micelles." *Acta biomaterialia*. 2015; 14:115-124
- Yuan Z-M, Huang Y, Ishiko T, Nakada S, Utsugisawa T, Shioya H, Utsugisawa Y, Shi Y, Weichselbaum R, Kufe D. "Function for p300 and not CBP in the apoptotic response to DNA damage." *Oncogene*. 1999; 18:5714-5717
- Zha YY, Yang B, Tang ML, et al. "Concentration-dependent effects of fullerene on cultured hippocampal neuron viability." *Int J Nanomedicine*. 2012; 7:3099-3109
- Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. "Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments." *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2008; 83:761-769
- Zhang, Y-N, Poon W, Tavares AJ, McGilvray ID, Chan WCW. "Nanoparticle-liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination." *Journal of Controlled Release*. 2016; 240:332-348
- Zhang Y-W, Shi J, Li Y-J, Wei L. "Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity." *Archivum immunologiae et therapeutiae experimentalis*. 2009; 57:435-445

- Zhao Y, Chen F, Pan Y, Li Z, Xue X, Okeke CI, Wang Y et al. "Nanodrug formed by coassembly of dual anticancer drugs to inhibit cancer cell drug resistance." *ACS applied materials & interfaces*. 2015; 7:19295
- Zordoky BNM, Anwar-Mohamed A, Aboutabl ME, El-Kadi AOS. "Acute doxorubicin cardiotoxicity alters cardiac cytochrome P450 expression and arachidonic acid metabolism in rats." *Toxicology and applied pharmacology*. 2010; 242:38-46
- Zou A, Huo M, Zhang Z, Zhou J, Yin X, Yao C, Zhu Q, Zhang M, Ren J, Zhang, Q. "Ostreotide-Modified N-Octyl-O, N-Carboxymethyl Chitosan Micelles as Potential Carriers for Targeted Antitumor Drug Delivery." *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012; 101:627-640

Biografija autora



Mariana Seke je rođena 09.09.1981. godine u Beogradu. Prvu beogradsku gimnaziju, prirodno-matematički smer, završila je 2000. godine. Iste godine upisala je Biološki fakultet u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija. Diplomirala je 2008. godine sa prosečnom ocenom 8,74.

Master studije započela je na Fakultetu za Fizičku hemiju u Beogradu, 2009. godine. Masterirala je 2010. godine sa zvanjem Mastera Fizičke hemije. Iste godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu u Beogradu, smer Molekularna biologija eukariota. Godine 2018. prelazi na Prirodno-matematički fakultet, Univerziteta u Novom Sadu, gde nastavlja doktorske studije na smeru: Doktor bioloških nauka.

Od 2011. godine angažovana je kao istraživač pripravnik, na nacionalnom integralnom projektu „Funkcionalni, funkcionalizovani i usavršeni nanomaterijali”, u Institutu za nuklearne nauke „Vinča”. Godine 2015. prelazi u više istraživačko zvanje, Istraživač saradnik. Do sada je objavila 12 naučnih radova u međunarodnim časopisima, od kojih su dva proizašla iz ove doktorske teze, jedno poglavlje u knjizi i više međunarodnih saopštenja. Član je planinarsko-skijaškog društva "Poštar" iz Novog Sada, za koji piše popularno-naučne tekstove o biljnom i životinjskom svetu.

Novi Sad,

Mariana Seke

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:
RBR
Identifikacioni broj:
IBR
Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD
Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ
Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR
Ime i prezime autora: Mariana Seke
AU
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): dr Nebojša Andrić, docent
MN dr Aleksandar Đorđević, redovni
profesor
Naslov rada: Uloga dva nanokompozita
NR fulerenol/doksorubicin i
fulerenol/gvožđe kod toksičnih efekata
izazvanih doksorubicinom
srpski (latinica)
Jezik publikacije: srpski / engleski
JP
Jezik izvoda: srpski / engleski
JI
Zemlja publikovanja: Srbija
ZP
Uže geografsko područje: Vojvodina
UGP
Godina: 2020
GO
Izdavač: Autorski reprint
IZ
Mesto i adresa: Prirodno-matematički fakultet,
MA Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad
Fizički opis rada: (broj poglavlja / stranica / slika / tabela/
FO referenci / priloga)
(7/ 154 / 45/ 7 / 386 / 4)
Naučna oblast: Biologija
NO
Naučna disciplina:

ND

Predmetna odrednica, ključne reči:

fulerenol/doksorubicin nanokompozit, fulerenol/gvožđe nanokopozit, nanokarakterizacija, citotoksičnost, ćelijski ciklus, kardiotoksičnost, hepatotoksičnost, nanodostava lekova, tkivo srca, tkivo jetre, antioksidativni enzimi, apoptoza

PO

UDK

Čuva se:

ČU

Biblioteka departmana za biologiju i ekologiju,
PMF-a u Novom Sadu
nema

Važna napomena:

VN

Izvod:

IZ

Tumori predstavljaju drugi vodeći uzrok smrti u svetu (posle kardiovaskularnih bolesti) i procena je da će učestalost pojave tumora u budućnosti porasti. Hemioterapija je jedna od najčešće korišćenih metoda lečenja tumora koju često prate sporedni sistemski štetni efekti. S obzirom da lečenje tumora jednim terapijskim agensom često rezultuje ograničenim kliničkim ishodom, kombinovane terapije mogu sinergistički podići nivo antitumorske aktivnosti, dok sniženjem doze svakog pojedinačnog agensa se mogu umanjiti štetni efekti. Istovremena aplikacija različitih terapijskih agenasa zahteva dostavnu platformu kako bi se omogućila normalizacija farmakokinetike i farmakodinamike agenasa. Fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ predstavljaju pogodnu platformu za dostavu lekova zbog svojih fizičko-hemijskih i bioloških karakteristika. U vodenom rastvoru fulerenol se nalazi u obliku negativno naelektrisanih polianjonskih nanočestica koje poseduju veliku površinu i imaju mogućnost vezivanja pozitivno naelektrisanih hemioterapeutika kao što je doksorubicin (DOX), kao i pozitivnih jona metala, u ovom slučaju Fe^{2+} . Osnovna biološka karakteristika fulerenola je da ima ulogu antioksidativnog agensa.

U ovom radu iskorišćene su fizičko-hemijske osobine fulerenolskih nanočestica (FNP), DOX-a i Fe^{2+} u cilju formiranja stabilnih nanokompozita FNP/DOX i FNP/ Fe^{2+} . Nanokompoziti su okarakterisani različitim fizičko-hemijskim metodama, pri čemu je ustanovljeno da su čestice nanokompozita FNP/DOX veličine između 20 i 58 nm, naelektrisanja od -6 mV, čestice nanokompozita FNP/ Fe^{2+} veličine između 11 i 60 nm, naelektrisanja od -30.8 mV, i diskoidalne morfologije. Oba nanokompozita imaju dobru stabilnost u vodenom rastvoru, što ih čini biokompatibilnim i pogodnim za primenu u medicini. FNP dekorisan DOX-om, u obliku nanokompozita FNP/DOX, omogućava značajno obimniji unos DOX-a u ćelije i smanjuje procenat ćelija u G2M fazi ćelijskog ciklusa, u odnosu na samostalnu primenu DOX-a, kod malignih ćelijskih linija dojke. DOX se u terapiji tumora koristi poslednjih četrdeset godina i još uvek predstavlja nezaobilazan lek u onkologiji. Njegovo dugotrajno korišćenje izaziva oksidativni stres, što za posledicu ima pojavu kardiomiopatije i hepatopatije. Kardio i hepatotoksičnost nanokompozita FNP/DOX u odnosu na komercijalni DOX ispitana je na odraslim mužjacima pacova soja Wistar. Ultrastrukturalna analiza tkiva srca i jetre pokazala je da tretman DOX dovodi do oštećenja pojedinih ćelijskih kompartmana, kao što su mitohondrije, miofibrili, kompromituje integritet sarkoleme i dovodi do hiperkontrakcije sarkomera, unutarćeliskog edema, vakuolizacije citoplazme, pojave mijelinskih figura, autofagozoma i mikrovezikularnih masnih promena. Nanokompozit FNP/DOX izaziva manje štetnih promena na srcu i jetri zdravih pacova soja Wistar, u poređenju sa komercijalnim DOX-om, pri čemu je doza od 4 mg/kg postigla bolji efekat nego doza od 2 mg/kg. Na molekularnom nivou, kvantifikovana je ekspresija gena: Bax i Bcl-2 koji učestvuju u apoptozi, kao i katalaza i mangan superoksid dismutaza

(MnSOD), koji učestvuju u odgovoru ćelije na oksidativni stres.

Nanokompozit FNP/DOX menja gensku ekspresiju antioksidativnih enzima, ukazujući na prisustvo manjeg oksidativnog stresa u tkivu srca i jetre, u poređenju sa dejstvom komercijalnog DOX. Nanokompozit FNP/DOX u tkivu srca, menja i gensku ekspresiju ključnih enzima apoptoze, Bax i Bcl-2, pri čemu inicira povećanu transkripciju antiapoptotskog Bcl-2 gena, omogućavajući ćelijama da se odupru programiranoj ćelijskoj smrti. Promene ekspresije iRNK za dva antioksidativna gena kao i za dva gena koja učestvuju u apoptozi, u srcu i jetri, ne mogu da ukažu na jasan mehanizam preko koga FNP/DOX izaziva manje štetnih promena na srcu i jetri zdravih pacova soja Wistar, u poređenju sa komercijalnim DOX-om. Kardiotoksičnost doksorubicina se pripisuje slobodnoradikalskom oksidativnom stresu zasnovanom na gvožđu. Hidroksil radikal, direktno je odgovoran za oštećenja na DNK i nastaje u reakciji H_2O_2 i $O_2^{\cdot-}$ koja je katalizovana jonima gvožđa (Fe^{2+}). Dodatno, kada se DOX veže za iRNK koja kodira feritin dolazi do modifikacije ekspresije feritina što utiče na metabolizam i homeostazu gvožđa. Stoga, helatori gvožđa mogu interferirati sa DOX na mnogo složeniji način nego što je Fentonova reakcija. U ovoj tezi iskorišćene su helatorske sposobnosti FNP da za sebe veže jone gvožđa u formi nanokompozita FNP/ Fe^{2+} i spitani su njegovi biološki efekti *in vivo* na pacovima soja Wistar. Nanokompozit FNP/ Fe^{2+} u predtretmanu 1h pre primene DOX-a, je pokazao da izaziva manje štetnih promena na srcu i jetri zdravih pacova soja Wistar, u poređenju sa komercijalnim DOX-om. Rezultati na nivou genske ekspresije, prilikom primene nanokompozita FNP/ Fe^{2+} u predtretmanu 1h pre doksorubicina, za dva antioksidativna gena u srcu i jetri, ne mogu da ukažu na

jasan mehanizam preko koga nanokompozit FNP/Fe²⁺ izaziva manje štetnih promena na srcu i jetri zdravih pacova soja Wistar, u poređenju sa komercijalnim DOX-om. Sveukupno gledano ovo istraživanje je omogućilo detaljniji uvid u kompleksnu interakciju između fulerenolskih nanočestica, doksorubicina, Fe²⁺ i ćelija, kako malignih tako i zdravih. Pokazan je protektivni potencijal fulerenolskih nanočestica kada se kombinuju sa citostatikom doksorubicinom i sa Fe²⁺, a što može imati pozitivne implikacije prilikom dizajniranja antitumorskih lekova.

Datum prihvatanja teme od strane Senata: 25.06.2020.god.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

(ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status)

KO

predsednik: dr Danijela Kojić, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

član: dr Jelena Purać, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

član: dr Jelena Marković, docent, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

član: dr Vladimir Srdić, redovni profesor, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

član: dr Nebojša Andrić, docent, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

član: dr Aleksandar Đorđević, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCE
KEY WORDS DOCUMENTATION

ANO
Identification number:
INO
Document type: Monograph type
DT
Type of record: Printed text
TR
Contents code: Doctoral disertation
CC
Author: Mariana Seke
AU
Mentor: dr Nebojša Andrić
MN
dr Aleksandar Đorđević
Title:
TI
Language of text: Serbian (latin)
LT
Language of abstract: english / serbian
LA
Country of publication: Serbia
CP
Locality of publication: Vojvodina
LP
Publication year: 2020
PY
Publisher: Author's reprint
PU
Publication place: Prirodno-mateatički fakultet,
PP Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad
Physical description: (chapters / pages / figures / tables/
PD references / appendixes)
(7/ 154 / 45/ 7 / 386 / 4)
Scientific field
SF Biology
Scientific discipline
SD
Subject, Key words
SKW fulerenoll/doxorubicin nanokomposite,
fulerenoll/iron nanokomposite,
nanocharacterisation, cytotoxicity, cell
cycle, cardiotoxicity, hepatotoxicity,
nano drug delivery, heart tissue, liver
tissue, antioxidative enzymes, apoptosis
UC
Holding data: Library of Department of Biology and
HD Ecology

Trg Dositeja Obradovića 3
none

Note:

N

Abstract:

AB

Tumors are the second leading cause of death in the world (following cardiovascular diseases) and it is estimated that the incidence of tumors will increase in the future. Chemotherapy is one of the most common methods of tumor treatment which is often accompanied by systemic side effects. Treatment of tumors with one therapeutic agent often results in limited clinical outcome. Combination therapy, using a variety of agents and modalities of action, can synergistically increase the level of antitumor activity, lowering the dose of each single agent and thus reduce adverse side effects. The simultaneous application of various therapeutic agents requires a delivery platform to enable normalization of agents' pharmacokinetics and pharmacodynamics. Because of its physico-chemical and biological activities, fullereneol $C_{60}(OH)_{24}$ represents a suitable platform for drug delivery. In the aqueous solution fullereneol is in the form of negatively charged polyanionic nanoparticles (FNP) that possess a large surface area and have the ability of binding positively charged chemotherapeutic drug, such as doxorubicin (DOX), as well as positively charged metal ions, particularly Fe^{2+} . The main biological activity of fullereneol is manifested through its antioxidant activity. In this study we used physico-chemical properties of fullereneol, doxorubicin and iron (Fe^{2+}) in order to form stable fullereneol/doxorubicin (FNP/DOX) nanocomposite and fullereneol/iron (FNP/ Fe^{2+}) nanocomposite. The nanocomposites were characterized by different physical-chemical methods which showed that FNP/DOX has particle size between 20 nm and 58 nm and charge of -6 mV, while FNP/ Fe^{2+} has particle size between 11 nm and 60 nm and charge of -30.8 mV. Both nanocomposites revealed discoidal morphology. The nanocomposites have also displayed good stability in aqueous systems, which make

them biocompatible and suitable for use in biomedical applications. FNP decorated with DOX, in the form of FNP/DOX nanocomposite, allows significantly more extensive DOX uptake into cells and reduces the percentage of cells in the G2M phase of the cell cycle, compared to the independent application of DOX, in malignant breast cell lines. DOX has been used in the treatment of cancer for the last forty years and still represents an irreplaceable drug in oncology. Its long-term use leads to cardiomyopathy and hepatopathy, while its main mechanism of toxicity is induction of oxidative stress. Cardio and hepatotoxicity of FNP/DOX nanocomposite in comparison to DOX was tested on healthy adult male Wistar rats. Ultrastructural analysis of heart and liver tissues revealed that treatment with DOX induced injuries within different cell compartments, such as: mitochondria, myofibrils and nuclei. Compromised integrity of sarcolemma, hypercontraction of sarcomeres, interstitial edema, and vacuolization of the cytoplasm, presence of myelin figures, autophagosomes and microvascular fatty changes have also been observed. Contrary to these findings, FNP/DOX nanocomposite induced significantly less injury to the heart and liver tissues compared to DOX, with a dose of 4 mg /kg FNP/DOX achieving a better effect than a dose of 2 mg /kg. At the molecular level, the expression of the genes: Bax and Bcl-2, which participate in apoptosis, as well as catalase and manganese superoxide dismutase (MnSOD), which participate in the cell's response to oxidative stress, has been quantified. FNP/DOX nanocomposite changed the gene expression levels of the antioxidant enzymes indicating the presence of decreased oxidative stress in heart and liver tissues in comparison with DOX. Furthermore, FNP/DOX nanocomposite in heart tissue changed gene expression levels of enzymes involved in apoptosis, Bax and Bcl-2; it increased transcription levels of the

antiapoptotic Bcl-2 gene, enabling cells to resist to the programmed cell death. Changes in mRNA expression for two antioxidant genes as well as for two genes involved in apoptosis, in the heart and liver tissues, cannot indicate a clear mechanism by which FNP/DOX causes less harmful effects in the heart and liver of healthy Wistar rats, compared to DOX applied alone. Cardiotoxicity of DOX is attributed to iron-based free radical oxidative stress. The hydroxy radical is directly responsible for DNA damage and is formed in the reaction of H_2O_2 and $\text{O}_2 \cdot^-$ - which is catalyzed by iron ions (Fe^{2+}). Additionally, when DOX binds to mRNA encoding ferritin, ferritin expression is modified, which affects iron metabolism and homeostasis. Therefore, iron chelators can interfere with DOX in a much more complex way than the Fenton reaction. In this thesis, the chelation characteristics of FNP to bind iron ions in the form of FNP/ Fe^{2+} nanocomposite were used and its biological effects in vivo on Wistar rats were examined. At the ultrastructural level, FNP/ Fe^{2+} nanocomposite in pretreatment 1h before DOX administration was shown to cause less detrimental changes to the heart and liver tissues of healthy Wistar rats, compared to DOX applied alone. At the level of gene expression, FNP/ Fe^{2+} nanocomposite in pretreatment 1h before DOX administration, for two antioxidant genes in the heart and liver tissues, cannot indicate a clear mechanism through which FNP/ Fe^{2+} nanocomposite causes less harmful effects in heart and liver. Overall, this research has enabled a more detailed insight into the complex interaction between fullereneol nanoparticles, doxorubicin, Fe^{2+} and cells, both malignant and healthy. This experimental setup has provided an opportunity for a better understanding of the protective potential of fullereneol nanoparticles when combined with cytostatic DOX and Fe^{2+} , which may have positive implications during drug design.

Accepted on Senate on:

06/25/2020.

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board:

DB

president: dr Danijela Kojić, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

member: dr Jelena Purać, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

member: dr Jelena Marković, Assistant Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

member: dr Vladimir Srdić, Full professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad

member: dr Nebojša Andrić, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

member: dr Aleksandar Djordjevic, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Улога два нанокмозита фулернол/доксорубицин и фулеренол/гвожђе код токсичних ефеката изазваних доксорубицином
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Институт за нуклеарне науке „Винча”, Универзитет у Београду, б) Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду, в) Институт за хистологију и ембриологију „Александар Ћ. Костић” Медицинског факултета у Београду, Универзитет у Београду, г) Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, д) Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду, ђ) Институт техничких наука Српске Академије Наука и Уметности у Београду, е) Завод за експерименталну онкологију Института за онкологију Војводине, Сремска Каменица, ж) Технолошки факултет, Универзитет у Новом Саду, з) Институт „Јожеф Штефан” у Љубљани, Словенија
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске академске студије биологије на Природно-математичком факултету, Универзитета у Новом Саду Истраживања обухваћена овом докторском дисертацијом део су основних истраживања у оквиру пројекта „Функционални, функционализовани и усацршени наноматеријали”, број ИИИ 45005, који је финансирало Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.
1. Опис података
1.1 Врста студије <i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> <u>Докторска дисертација</u>
1.2 Врсте података а квантитативни б квалитативни
1.3. Начин прикупљања података

- a) анкете, упитници, тестови
- б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи
- в) генотипови: навести врсту _____
- г) административни подаци: навести врсту _____
- д) узорци ткива: срце и јетра пацова соја Вистар
- ђ) снимци, фотографије, навести врсту _____
- е) текст: преглед литературе
- ж) мапа, навести врсту _____
- з) остало: лабораторијски експерименти и мерења

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

- а) Excel фајл, датотека: .xlsx
- б) SPSS фајл, датотека _____
- в) PDF фајл, датотека: .pdf
- г) Текст фајл, датотека: .docx
- д) JPG фајл, датотека: .jpg, .tiff
- е) Остало, датотека _____

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- а) број варијабли: велики број
- б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.): велики број

1.3.3. Поновљена мерења

- а) да
- б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) временски размак између поновљених мера је _____
- б) варијабле које се више пута мере односе се на _____
- в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

- а) Да
- б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент: анализа мерења величине и наелектрисања наночестица, анализа вијабилности ћелија, анализа ћелијског уноса наночестица, анализа ћелијског циклуса, ултраструктурна анализа ткива трансмисионом електронском микроскопијом, qRT-PCR анализа ткива

б) корелационо истраживање: анализа експерименталних података Student-овим t -тестом

ц) анализа текста: прикупљање литературних података

д) остало, навести шта _____

2.1.2 *Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).*

Nano-ZetaSizer, AFM микроскоп, ТЕМ микроскоп, спектофотометар, проточни цитометар, qRT-PCR анализатор

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? _____

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан статистичком проценом добијених резултата, као и поређењем експерименталних и теоријских података.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Статистичком контролом изведеног резултата.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у репозиторијуму докторских дисертација Универзитета у Новом Саду.

3.1.2. URL адреса <https://cris.uns.ac.rs/searchDissertations.jsf>

3.1.3. DOI

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.
Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен?

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму?

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да Не

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности

(https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживања: Сви експерименти су одобрени од стране Министарства пољопривреде и заштите животне средине Републике Србије, управа за ветерину, број 323-07-03640/2015-05 и у сагласности са одредбама Закона о добробити животиња (Службени гласник РС, бр 41/09

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани

ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Уз претходну комуникацију и писмено одобрење власника података.

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

По захтеву ће заинтересованим истраживачима материјал бити послат електронским путем.

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство-некомерцијално

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Мариана Секе, е-mail: marianaseke@yahoo.com

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Мариана Секе, е-mail: marianaseke@yahoo.com

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Мариана Секе, е-mail: marianaseke@yahoo.com